



Étude de l'implication des microglies dans la pathogenèse de l'encéphalite herpétique expérimentale

Thèse

Olus Uyar

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

Québec, Canada



**Étude de l'implication des microglies dans la pathogenèse
de l'encéphalite herpétique expérimentale**

Thèse

Oluş Uyar

Doctorat en microbiologie-immunologie

Philosophiae doctor (PhD)

Québec, Canada

Guy Boivin, directeur de recherche

© Oluş Uyar, 2022

Résumé

Les infections au virus herpès simplex I (VHS-1) sont souvent bénignes mais peuvent être responsables de pathologies sévères, telle que l'infection du système nerveux central, telle que l'encéphalite herpétique (EH). Cette dernière représente l'encéphalite virale sporadique la plus répandue dans les pays développés. Malgré la disponibilité des antiviraux, le taux de mortalité est de plus que 30%. De plus, la majorité des survivants souffrent des séquelles neurologiques. Le mécanisme par lequel l'encéphalite herpétique est létale n'est pas encore clairement établi. Bien que la réplication virale cause des dommages importants, de plus en plus d'évidences suggèrent que l'inflammation induite en réponse à l'infection joue également un rôle dans la pathogénèse de cette maladie. L'hypothèse principale de notre équipe est que la réponse immunitaire cérébrale innée induite au cours de cette infection est une arme à double tranchant car elle est critique pour contenir la réplication virale dans le cerveau durant la phase précoce de la maladie, mais si elle est incontrôlée, elle peut résulter en une réponse inflammatoire exacerbée qui peut être néfaste.

Les microglies sont les seules cellules immunitaires résidentes du cerveau. Plusieurs études ont rapporté que ces cellules qui forment la première ligne de défense, jouaient un rôle clé dans le contrôle des infections du SNC. En revanche, la microglie réactive semblerait contribuer à la neuroinflammation. De plus, il est proposé que ces microglies réactives participent à la perturbation de la barrière hématoencéphalique au cours de l'EH, que nous avons également pu constater chez la souris BALB/c infectée par la voie intranasale, décrite dans la première partie de nos travaux. Cependant, le rôle exact des microglies dans l'EH n'a pas encore été élucidé. Alors, nous avons décidé de mener des travaux dans le but de comprendre l'implication des microglies dans le contrôle de l'EH et de caractériser les mécanismes exploités par ces cellules.

Pour atteindre nos objectifs, nous avons d'abord évalué l'effet de l'activation des microglies par le « *macrophage colony-stimulating factor* » (M-CSF) administré avant l'infection. Ce traitement a significativement augmenté la survie des souris et diminué les titres viraux cérébraux au J6 p.i. En parallèle, l'augmentation du nombre de microglies CD68⁺ observée dans les cerveaux des souris traitées avec du M-CSF a mené à l'hypothèse que la microglie CSF1R⁺ était responsable de cette amélioration du pronostic de l'EH. Pour

répondre à cette question, nous avons déplété la microglie chez des souris CSF1R-loxP-CX3CR1-cre/ERT2. Le taux de survie réduit et des titres viraux cérébraux plus élevés pour ces souris déplétées des microglies ont souligné l'importance de la réponse microgliale dans la phase précoce de l'infection. Suivant ces observations, les mécanismes impliqués dans la réponse immunitaire microgliale au cours de l'EH ont été étudiés à l'aide de la microscopie électronique et du séquençage d'ARNm sur une cellule unique. Dans cette partie, nous avons étudié uniquement les microglies situées dans le noyau postéro-ventral (VPL, pour « *Ventral posterolateral nucleus* »), qui a été identifié, à l'aide du VHS-1 recombinant neurovirulent que nous avons décrit dans la première partie des travaux, comme la région la plus infectée du cerveau chez des souris C57BL/6 au J6 p.i. Nos analyses ont confirmé que ces cellules limitaient l'infection à l'aide de la phagocytose et de la présentation d'antigènes. En outre, nous avons pu décrire une nouvelle réponse transcriptionnelle, associée à une population cellulaire rare, que nous avons appelées des microglies « *en transition* ». L'expression élevée des transcrits viraux par ces cellules pourrait correspondre à la réponse immunitaire antivirale intrinsèque des microglies infectées par le VHS-1 dans le VPL. Enfin, l'analyse de ce transcriptome révélant l'augmentation d'expression des gènes impliqués dans la production d'interleukine IL-1 β médiée par l'inflammasome NLRP (pour « *Nucleotide-binding oligomerization domain, Leucine rich Repeat and Pyrin domain containing* ») 3, a suggéré que ces microglies « *en transition* » infectées favoriseraient l'exacerbation de l'inflammation au cours de l'EH.

L'ensemble de nos données montrent que les microglies sont nécessaires en phase précoce pour un meilleur contrôle de l'EH. Ceci peut évoluer vers un phénotype pro-inflammatoire et contribuer ensuite à l'exacerbation de l'inflammation. De plus, nos résultats suggèrent que l'infection de ces microglies du VPL par le VHS-1 pourrait ainsi induire l'acquisition de cette réponse transcriptionnelle pro-inflammatoire.

Abstract

Herpes simplex virus I (HSV-1) infections are often mild, but can be responsible for severe pathologies, such as the infection of the central nervous system, also called herpes simplex encephalitis (HSE). The latter is the most common sporadic viral encephalitis in developed countries. Despite available antivirals, the mortality rate is higher than 30%. In addition, most survivors suffer from neurological sequelae. The mechanism by which herpes encephalitis is lethal is not yet clearly established. Although viral replication causes significant neural damage, growing evidence suggests that the inflammatory response also plays a major role in the pathogenesis of HSE. The main hypothesis of our team is that the innate immune response induced by HSV-1 infection is a double-edged sword. We believe that this immune response, critical to limit viral replication in the brain during the early phase of the disease, become later uncontrolled, and result in an exacerbated inflammatory response which is deleterious.

Microglia are the only resident immune cells in the brain. Several studies reported that these cells, which form the first line of defense, play a key role in controlling CNS infections. In contrast, reactive microglia appear to contribute to neuroinflammation. In addition, it is proposed that these reactive microglia participate in the disruption of the blood-brain barrier during HSE, which we have also been able to observe in intranasally-infected BALB/c mice, as described in the first part of our work. However, the exact role of microglia in HE has not yet been elucidated. So, we decided to conduct this research to understand the involvement of microglia in the control of HE and to characterize the mechanisms exploited by these cells.

We first evaluated the effect of microglial activation by macrophage colony-stimulating factor (M-CSF) administered prior to the infection. This treatment significantly increased survival rate and decreased brain viral titers at day 6 pi. In parallel, the increased number of CD68⁺ microglia found in the brains of M-CSF treated mice led the question whether CSF1R⁺ microglia were responsible for this improvement of HSE prognosis. To answer that question, we depleted microglia using CSF1R-loxP-CX3CR1-cre/ERT2 mice. The reduced survival rate and higher brain viral titers for these microglia-depleted mice highlighted the importance of the microglial response during the early phase of infection.

Following these observations, the mechanisms involved in the microglial immune response during HSE have been investigated using electron microscopy and single cell mRNA sequencing. In this part, we studied only the microglia located at VPL, which was identified as the most infected region of the infected C57BL/6 brain on day 6 p.i. using a new neurovirulent recombinant HSV-1 that we described in the first part of our work. Our results confirmed that microglia limit the infection by phagocytosis and antigen presentation. Furthermore, we described a new transcriptional response, associated with a rare cell population in VPL (Ventral posterolateral nucleus), which we called “in transition” microglia. The high expression of viral transcripts by these cells suggested that this distinct transcriptome might correspond to the intrinsic antiviral immune response of HSV-1-infected microglia in the VPL. Finally, the analysis of this transcriptome revealing the increased expression of genes involved in the production of interleukin IL-1 β mediated by the NLRP3 inflammasome, suggested that these infected "in transition" microglia would promote the exacerbation of the inflammation in HE.

Altogether, our work shows that the microglia, necessary in the early phase for a better control of HSE, can evolve towards a pro-inflammatory phenotype and contribute to the exacerbation of inflammation. Moreover, our results suggest that the infection of microglia by HSV-1 in VPL could thus induce the acquisition of this pro-inflammatory transcriptional response.

Tables des matières

Résumé	ii
Abstract	iv
Tables des matières	vi
Liste des figures	x
Liste des abréviations	xii
Épigraphe	xx
Remerciements	xxi
Avant-propos	xxiii
Introduction	1
Section-I : L'aspect virologique de l'EH	1
1. La description générale des virus herpétiques	1
2. Les virus herpétiques infectant l'humain.....	2
2.1. La mode de transmission des Herpesviridae humains	3
2.2. La taxonomie et la phylogénie des Herpesviridae humains.....	4
3. Le VHS-1.....	6
3.1. Les structures	6
3.2. La réplication virale	10
3.3. La latence	19
3.4. La neurovirulence	21
4. La transmission et la pathogenèse des VHS.....	23
5. L'épidémiologie	24

5.1. L'épidémiologie des maladies liées aux infections aux VHS :.....	24
6. Les manifestations cliniques des maladies liées aux infections herpétiques.....	27
6.1. Le diagnostic des maladies liées aux infections aux VHS.....	30
7. Les manifestations cliniques de l'EH	31
7.1. Le diagnostic de l'EH	34
8. Les traitements antiviraux	36
8.1. Le traitement de l'EH.....	38
9. Les vaccins	40
10. L'édition génomique du VHS-1 et l'utilisation des VHS-1 recombinants.....	41
Section-II : L'aspect neuroimmunologique de l'EH.....	45
1. Les barrières du SNC.....	45
2. Reconnaissance du VHS-1	47
2.1. Les TLRs.....	48
2.2. Les RLRs	49
2.3. Les NLRs	50
2.4. Les autres récepteurs cytosoliques.....	51
3. Le déclenchement de la réponse antivirale.....	52
4. La réponse immunitaire des cellules du SNC.....	54
4.1. La réponse neuronale	54
4.2. La réponse des cellules gliales du SNC	58
5. La réponse immunitaire des cellules infiltrantes	82

5.1. Les cellules myéloïdes	82
5.2. Les cellules lymphoïdes	88
5.3. Les autres cellules immunitaires	96
6. Les mécanismes d'échappement immunitaire du VHS-1	97
CHAPITRE-I.....	102
1. Les hypothèses et les objectifs de recherche	102
2. Aperçu des résultats et contribution scientifique :	104
Chapitre-II : La génération et la caractérisation d'un nouveau virus herpès simplex 1 recombinant permettant la surveillance in vivo de l'EH expérimentale.....	105
1. Résumé	106
2. Abstract.....	107
3. Article 1	108
3.1. Introduction.....	109
3.2. Results.....	110
3.3. Discussion	117
3.4. Materials and methods	121
3.5. References.....	129
Chapitre-III : L'implication de la microglie dans le contrôle de l'infection en phase précoce de l'EH expérimentale.....	150
1. Résumé	151
2. Abstract.....	152
3. Article 2	153

3.1. Introduction.....	156
3.2. Results.....	157
3.3. Discussion.....	164
3.4. Materials and Methods.....	169
3.5. References.....	175
Chapitre-IV : L'analyse transcriptionnelle des cellules immunitaires isolées du noyau postéro-ventral a révélé une contribution potentielle des microglies infectées à la réponse inflammatoire exacerbée au cours de l'EH expérimentale.....	
1. Résumé :	197
2. Abstract.....	198
3. Article 3	200
3.1. Background.....	201
3.2. Methods	203
3.3. Results.....	211
3.4. Discussion.....	221
3.5. Conclusion	227
3.6. References.....	230
CHAPITRE-V : Discussion	259
CONCLUSION	287
BIBLIOGRAPHIE:	290

Liste des figures

Figure-1 : Illustration schématique de l'organisation du génome et des principaux composants structurels du VHS-1.....	7
Figure-2 : Les glycoprotéines et les récepteurs d'entrée du VHS-1	10
Figure-3 : Cycle de réplication du VHS-1	13
Figure-5 : La représentation schématique de l'assemblage et de la sortie du VHS-1	18
Figure-6 : Impact du VHS-1 sur l'organisation de la chromatine.....	20
Figure-7 : Propagation du VHS-1 au SNC via le NT et olfactif.....	33
Figure-8 : Les corrélats cliniques, physiopathologiques et radiologiques au cours de l'EH	35
Figure-9 : Mécanisme d'action des analogues d'acide nucléique anti-herpétique.....	37
Figure-10 : L'édition génomique du VHS-1 à l'aide du système CRISPR/Cas9	44
Figure-11 : Les classes de récepteurs de reconnaissance impliqués dans la reconnaissance des acides nucléiques viraux dans les cellules de mammifères.	47
Figure-12 : Les voies de signalisation impliquées dans la réponse cellulaire intrinsèque au cours de l'EH chez la souris.....	55
Figure-13 : La CXCL1 dérivée d'astrocytes et de neurones entraîne la transmigration des neutrophiles et perturbe la perméabilité de la BHE dans l'EH.	64
Figure-14 : Origine et développement de la microglie	67
Figure-15 : L'implication de la microglie suite à l'infection virale du SNC.....	76
Figure-16 : Le cGAS déclenche la réponse antivirale induite par l'IFN-I, mais est également impliqué dans l'activation de l'apoptose chez les cellules immunitaires infiltrantes.	79
Figure-17 : Les cellules et les facteurs génétiques essentiels impliqués dans la réponse immunitaire au cours de l'EH chez la souris.....	95

Liste des tableaux

Tableau-I : Taxonomie des Herpesviridae infectant l'humain.....	5
Tableau-II : Principales protéines virales impliquées dans l'évasion immunitaire	100
Tableau-III : Principaux mécanismes d'évasion immunitaire du VHS-1	101

Liste des abréviations

- ABCA1 : de l'anglais « *ATP Binding Cassette Subfamily A Member 1* »)
- ACV : Acyclovir
- ADAM10 : de l'anglais « *ADAM Metallopeptidase Domain 10* »
- ADN: Acide désoxyribonucléique
- ADP : de l'anglais « *Adénosine diphosphate* »
- ALR : de l'anglais « *Melanoma 2 (AIM2) -like receptors* »
- AP-1 : de l'anglais « *Activator protein 1* »
- Aqp1 : de l'anglais « *Aquaporin 1* »
- ARN : Acide ribonucléique
- ARNc: ARN CRISPR
- ARNm: ARN messenger
- ARNsg: ARN guide unique
- ATG: de l'anglais « *Autophagy-related genes* »
- ATP: de l'anglais « *Adénosine triphosphate* »
- ATPase: de l'anglais « *Adenosine 5'-TriPhosphatase* »
- BAC : Chromosome bactérien artificiel
- BDNF : de l'anglais « *Brain-derived neurotrophic factor* »
- BHE : Barrière hémato-encéphalique
- BIR : de l'anglais « *Baculovirus inhibitor repeat* »
- c-FLIP: de l'anglais « *Cellular FLICE (FADD-like IL-1 β -converting enzyme)-inhibitory protein* »
- c-Kit : de l'anglais « *Receptor tyrosine kinase* »
- CARD : de l'anglais « *Caspase recruitment domain* »
- Cas9 : de l'anglais « *CRISPR-associated protein 9* »
- CCLx : de l'anglais « *Chemokine (C-C motif) ligand x* »)
- CD : de l'anglais « *Cluster of differentiation* »
- CDc : Cellule dendritique conventionnelle
- CDs : Cellule dendritique
- CDV : Cidofovir

cGAS: de l'anglais « *Cyclic GMP–AMP synthase* »
cGMP : Monophosphate de guanosine cyclique
Clec4e : de l'anglais « *C-Type Lectin Domain Family 4 Member E* »
CLR : de l'anglais « *C-type lectin receptors* »
CMH : Complexe majeur d'histocompatibilité
CMV : Cytomegalovirus
CR3 : de l'anglais « *Complement receptor 3* »
CRISPR: de l'anglais « *Clustered regularly interspaced short palindromic repeats* »
CSF1R: de l'anglais « *Colony-stimulating factor-1 receptor* »
CSH : Cellule souche hématopoïétique
CSN : Complexe de sortie nucléaire
CTLR : de l'anglais « *C-type lectin-like receptor* »
CXCLx : de l'anglais « *Chemokine (C-X-C motif) ligand x* »
Da: Dalton
DAI: de l'anglais « *DNA-dependent activator of IFN-regulatory factor* »
db : double brin
DDX41 : de l'anglais « *DEAD-Box Helicase 41* »
DUB : de l'anglais « *Herpesvirus déubiquitinase* »
EE : de l'anglais « *Early endosome* »
EBV : Virus Epstein-Barr
EEG : Électroencéphalogramme
EH : Encéphalite herpétique
ELISA : de l'anglais « *Enzyme-linked immunosorbent assay* »
eNOS : de l'anglais « *Nitric oxide synthase 3* »
ERK : de l'anglais « *Extracellular signal-regulated kinase 1/2* »
Facteur-F : facteur de fertilité
Fc : de l'anglais « *Fragment cristallisable* »
Fcrls : de l'anglais « *Fc receptor-like molecule* »
FCV : Famciclovir
FL : de l'anglais « *Flt-3 ligand* »

FOS : Fosarnet

Fxyd1 : de l'anglais « *FXYD Domain Containing Ion Transport Regulator 1* »

g : Glycoprotéine

G-CSF : de l'anglais « *Granulocyte colony stimulating factor* »

GFAP : de l'anglais « *Glial fibrillary acid protein* »

GLT-1 : de l'anglais « *Glutamate transporter 1* »

GM-CSF: de l'anglais « *Granulocyte-macrophage colony-stimulating factor* »

GMI : de l'anglais « *Ganglio-N-tetraosylceramide* »

Gpr34 : de l'anglais « *G Protein-Coupled Receptor 34* »

GSK-3B : de l'anglais « *Glycogen synthase kinase 3 beta* »

GT : ganglions trijumeaux

GULP1 : « *GULP PTB Domain Containing Engulfment Adaptor 1* »

H2-D1 : de l'anglais « *Histocompatibility 2, D region locus 1* »

HCF-1 : de l'anglais « *Host cell factor C1* »

HDR : de l'anglais « *Homology-directed repair* »

HHV: de l'anglais « *Human herpes virus* »

HLA-C: de l'anglais « *Major Histocompatibility Complex, Class I, C* »

Hoxb8 : de l'anglais « *Homeobox B8* »

HPN : de l'anglais « *Hepsin* »

Hrl2 : de l'anglais « *Herpes resistance locus-2* »

HVEM : de l'anglais « *Herpes virus entry mediator* »

ICAM-I : de l'anglais « *Intracellular adhesion molecule-1* »

ICTV : Comité international de taxonomie des virus

IFI16 : de l'anglais « *IFN- γ -inducible protein* »)

Ifitm3 : de l'anglais « *Interferon Induced Transmembrane Protein 3* »

IFN: Interféron

IFN- $\alpha\beta\gamma$ R: de l'anglais «*Type I and II interferon receptors* »

IFNAR1/2 : Récepteurs de l'IFN-I

Ig : Immunoglobuline

IKK: de l'anglais « *Inhibitor of nuclear factor kappa B (I κ B) kinase* »

IL : Interleukine
I_L : U_L inversé
ImmGen : Immunological Genome Project
IRAK : de l'anglais « *Interleukin-1 receptor (IL-1R) associated kinase* »
IRF: de l'anglais « *Interferon-regulatory factor* »
IRM : Imagerie par résonance magnétique
I_S : U_S inversé
I_{S-L} : U_S et U_L inversés
ISG : de l'anglais « *Interferon-stimulated genes* »
ISG15 : de l'anglais « *Interferon-stimulated gene product 15* »
ITIM : de l'anglais « *Immunoreceptor tyrosine-based inhibitory motif* »
IVIS : Système d'imagerie intravitale par bioluminescence
IκB : de l'anglais « *I kappaB kinase* »
JAK : de l'anglais « *Janus kinase* »
JAM : « *Junctional adhesion molecules* »
JEV : de l'anglais « *Japanese encephalitis virus* »
JNK : de l'anglais « *c-Jun N-terminal kinases* »
JS : Jonction serrée
KIR : « *Killer cell immunoglobulin-like receptor* »
LAG-3 : de l'anglais « *Lymphocyte Activation Gene-3* »
LAMP : de l'anglais « *Lysosomal/endosomal-associated membrane glycoprotein* »
LAT : de l'anglais « *Latency-associated transcripts* »
LB : Lymphocyte B
LBf : Lymphocyte B folliculaires
LBZM : Lymphocyte B de la zone marginale
LCR : Liquide céphalorachidien
LGP2 : de l'anglais « *Laboratory of genetics and physiology 2* »
LIR : de l'anglais « *LC-3 interacting region* »
LN : Lamina nucléaire
LRR : de l'anglais « *Leucine-rich repeat* »

LT : Lymphocyte T

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

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

M-CSF: de l'anglais « *Macrophage colony-stimulating factor* »

MA : Maladie d'Alzheimer

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

MAVS : de l'anglais « *Mitochondrial antiviral-signaling protein* »

MBP : de l'anglais « *Myelin basic protein* »

mCD : Cellule dendritique dérivée de monocyte

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

ME : Moelle épinière

MEGF10 : de l'anglais « *Multiple EGF Like Domains 10* »

MERTK : de l'anglais « *MER Proto-Oncogene, Tyrosine Kinase* »

MHV : de l'anglais « *Murine hepatitis virus* »

miARN : micro ARN

MMP : Métalloprotéases matricielles

MNE : Membrane nucléaire externe

MNI : Membrane nucléaire interne

MOI : de l'anglais « *Multiplicity of infection* »

Mx1 : de l'anglais « *MX Dynamin Like GTPase 1* »

MxB : de l'anglais « *Human myxovirus resistance protein B* »

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

NADPH : de l'anglais « *Nicotinamide adenine dinucleotide phosphate* »

NALP : de l'anglais « *NACHT, LRR and pyrin domains containing protease* »

NETose : de l'anglais « *Neutrophil Extra cellular Trap* »

NF-κB: de l'anglais « *Nuclear factor-kappa B* »

NG2: de l'anglais « *Nerve/glial antigen 2* »

NGF: de l'anglais « *Nerve growth factor* »

NHEJ : de l'anglais « *Non-homologous end joining* »

NK : Natural killer

NKT : Lymphocyte T *Natural Killer*

NLR : de l'anglais « *NOD-like receptor* »

NMDA : Récepteur de l'acide N-méthyl-D-aspartique

NO : oxyde nitrique

NT : Nerfs trijumeaux

NXF1 : de l'anglais « *Nuclear RNA export factor 1* »

OAS : de l'anglais « *2'-5'-oligoadenylate synthetase* »

Oasl1 : de l'anglais « *2'-5'-oligoadenylate synthase-like protein 1* »

Oct-1 : de l'anglais « *Octamer transcription factor* »

Olfml3: de l'anglais « *Olfactomedin-like protein 3* »

OPTN : de l'anglais « *Mitophagy adaptor optineurin* »

ORF: de l'anglais « *Open reading frame* »

P: Prototype

P2ry12: de l'anglais « *Chemoreceptor for adenosine diphosphate* »

p38 : de l'anglais « *p38 mitogen-activated protein kinase* »

p62/SQSTM1 : de l'anglais « *Autophagy adaptor protein sequestosome* »

PAM : Motif adjacent de *protospacer*

PAMP : de l'anglais « *Pathogen-associated molecular patterns* »

pARNi : Petit ARN interférent

Pb : paire de bases

PCR : de l'anglais « *Polymerase Chain Reaction* »

PCV : Penciclovir

PD1 : de l'anglais « *Programmed cell death protein 1* »

PEM : Progéniteur érythromyéloïde

PFA : Paraformaldéhyde

PHEV : de l'anglais « *Porcine hemagglutinating encephalomyelitis virus* »

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

PP1 α : de l'anglais « *Nuclear Protein Phosphatase 1 α* »

PRR : de l'anglais « *Pattern recognition receptor* »

PYD : de l'anglais « *Pyrin domain* »

RAG-1 : de l'anglais « *Recombination Activating 1* »

RE : Réticulum endoplasmique

RIP : de l'anglais « *Receptor-interacting protein* »

RLR: de l'anglais « *Retinoic-acid-inducible gene-1 (RIG-I)-like receptors* »

RLU : de l'anglais « *Relative Light Unit* »

RNase L : de l'anglais « *Ribonuclease L* »

ROS : Dérivés réactifs de l'oxygène

RTG : Réseau trans-Golgien

rVHS-1 : VHS-1 recombinant

S100A9 : de l'anglais « *S100 calcium-binding protein A9* »

SARS-CoV-2 : de l'anglais « *Severe acute respiratory syndrome coronavirus 2* »

scRNA-seq : Séquençage de l'ARN de cellule unique

SFV : Virus de la forêt de Semliki

SH: Sulfate d'héparane

Shank3: de l'anglais « *SH3 And Multiple Ankyrin Repeat Domains 3* »

Siglec5: de l'anglais « *Sialic Acid Binding Ig Like Lectin 5* »

Siglech: de l'anglais « *Sialic acid-binding immunoglobulin-type lectin* »

SINV: Virus Sindbis

SNC : Système nerveux central

SNP : Système nerveux périphérique

SNPs : de l'anglais « *Single-nucleotide polymorphism* »

SP : Sclérose en plaques

STAT: de l'anglais « *Signal Transducers and Activators of Transcription* »

STING: de l'anglais « *Stimulator of Interferon Genes* »

TAP: de l'anglais « *Human transporter associated with antigen presentation* »

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

td-UMAP : Représentation bidimensionnelle UMAP

Tfh: de l'anglais « *Follicular T helper lymphocytes* »

TGF: de l'anglais « *Tumor growth factor* »

Tie2 : de l'anglais « *Angiopoietin-1 receptor* »

TIM-3 : de l'anglais « *T-cell immunoglobulin and mucin-domain containing-3* »
TK : Thymidine kinase
TLR : de l'anglais « *Toll-like receptor* »
Tmem119 : de l'anglais « *Transmembrane protein 119* »
TMEV: Virus murin Theiler's
TRAIL : de l'anglais « *TNF-related apoptosis-inducing ligand* »
Treg : Lymphocyte T régulatrice
TRIF : de l'anglais « *TIR-domain-containing adapter-inducing interferon- β* »
TrkB : de l'anglais « *Tropomyosin-related kinase receptor* »
U_L : de l'anglais « *unique long* »
UMAP : de l'anglais « *Uniform Manifold Approximation and Projection* »
UNV : Unité neurovasculaire
U_s : de l'anglais « *unique short* »
UV : Ultraviolet
VACV : Valacyclovir
VEGF : de l'anglais « *Vascular endothelial growth factor* »
VHC : Virus de l'hépatite C
vhs : de l'anglais « *Virus host shutoff* »
VHS-1 : Virus herpès simplex 1
VIH : Virus de l'immunodéficience humaine
VP: de l'anglais « *Viral protein* »
VPL : de l'anglais « *Ventral posterolateral nucleus* »
VSV : Virus de la stomatite vésiculaire
VVZ : Virus de la varicelle-zona
WB: de l'anglais « *Western Blot* »
WNV : de l'anglais « *West Nile virus* »
ZIKV : de l'anglais « *Zika virus* »
 α -TIF : de l'anglais « *α -trans-inducing factor* »

« Dans la vie, le guide le plus sûr est la science. »

Mustafa Kemal Atatürk

Remerciements

La thèse est une longue route à parcourir, qui nécessite de la patience et de la persévérance. Ce doctorat m'a appris beaucoup sur moi-même, en matière de connaissances, de gestion de temps et d'émotions et de partage. Un autre élément essentiel pour l'accomplissement d'une thèse est les gens qui nous entourent. L'achèvement de mes travaux n'aurait pas été possible sans l'aide précieuse de nombreuses personnes. Je tiens d'abord à remercier mon directeur de recherche, Guy Boivin, d'avoir cru en moi et de m'avoir donné la chance de faire partie de son équipe de recherche. Merci pour vos précieux conseils et votre confiance. Merci au Dr Jocelyne Piret qui m'a supervisé durant ma thèse. Je la remercie pour sa disponibilité et les longues discussions que nous avons eues. Je tiens aussi à remercier l'ensemble des membres de l'équipe ; Nathalie, Julie, Chantal, Marie-Christine, Liva, Yacine et Maire-Ève. Je les remercie pour leur aide, leur accueil, et leur gentillesse.

Je tiens ensuite à remercier les membres de mon jury de thèse : Professeur Benoit Barbeau de l'Université du Québec à Montréal, et les professeurs David Gosselin et Jérôme Estaquier de l'Université Laval, d'avoir accepté de faire partie de mon comité de thèse. Merci pour votre temps et votre contribution. Je tiens aussi à remercier tous nos collaborateurs ; Dr. Serge Rivest, Dr. Marie-Ève Tremblay, Dr. Jacques Corbeil, Dr. Luc Vallières et leurs équipes pour leur contribution à la réalisation de nos projets.

Je tiens à remercier Louis-André Lortie et Dr. Hélène Deveau, qui m'ont accordé leur confiance en m'acceptant plusieurs fois comme auxiliaire d'enseignement dans leurs classes. J'ai appris beaucoup d'eux, au sujet d'enseignement et de science.

Un doctorat sans amis est impossible. Alors commençons à les remercier ! Durant ma thèse, j'ai eu la chance de construire des amitiés solides parmi les étudiants de mon équipe, qui non seulement ont contribué à la réalisation de mes travaux de thèse, mais aussi ont rendu cette aventure plus belle et agréable. Je remercie Karima, Zeineb, Rafik, Coraline, Daniela et Clément. Je tiens à remercier spécialement Lina et Amel, que j'ai connues à la fin de mon doctorat, qui ne m'ont jamais laissé seul dans les moments difficiles. Je tiens également à remercier Flora et Gamze, qui sont devenues des membres de ma famille pour moi, Anaïs, Bruno, Katerina et William. Ils ont toujours été présents dans les hauts et les bas, la joie et la tristesse. Je remercie aussi mes amis ; Basak, Ilgin, Derya, Arda, Onur, Nilay, Gizem, Ozge,

Ezgi, Selim, Engin, Sevde, Nazli, Emrah, Cansin, Yorgos et plein d'autres que je ne pourrai malheureusement pas tous les nommer. Malgré la distance, ils ont toujours été à mes côtés. Merci à tous ! Merci d'enrichir ma vie !

Je voudrais remercier très chaleureusement mes parents, Ender et Selim. Un grand merci pour votre amour, vos encouragements et votre soutien inconditionnel malgré la distance. Je vous aime beaucoup ! Merci à mes grands-parents, Nigar, Necati, Yakup et Nefize, d'avoir toujours été là pour moi. Je remercie toute ma famille, notamment mon oncle Taner et ma tante Isik. Merci à eux d'avoir fait de moi ce que je suis aujourd'hui. Je remercie également mes beaux-parents, Lena et Harris, pour tout leur soutien. Et aussi à mon petit chat, Sarma (« *feuilles de vigne farcies* » en turc), qui ne m'a jamais laissé seul durant ce doctorat ! Finalement, je tiens énormément à remercier ma compagne de vie, Dafni, pour son amour, sa patience et ses encouragements permanents. Merci d'avoir accepté de traverser l'Atlantique avec moi ! Merci d'illuminer ma vie ! Ton aide au quotidien et au travail, était vital pour l'accomplissement de cette thèse.

Merci à vous tous et à tous ceux que j'ai pu oublier.

Je dédie cette thèse de doctorat à vous tous.

Avant-propos

Dans le cadre de mon doctorat, j'ai étudié l'implication des microglies dans la pathogène de l'encéphalite herpétique expérimentale. La présente thèse est subdivisée en 7 chapitres. Le premier chapitre est l'introduction qui consiste en une revue de la littérature sur le sujet. Le deuxième chapitre porte les hypothèses et les objectifs des travaux. Les chapitres articles II à IV sont constitués des articles scientifiques qui sont publiés dans des revues internationales. Ces articles sont présentés dans leurs versions finales acceptées pour publication.

Le chapitre II correspond à un article « **A novel bioluminescent herpes simplex virus 1 for in vivo monitoring of herpes simplex encephalitis** » dont je suis le premier co-auteur et qui a été publié dans la revue « *Scientific Reports* » le 21 Septembre 2021, et aucune modification a été apportée dans le texte inséré dans la présente thèse. Dans le cadre de ce manuscrit, nous avons généré et caractérisé le virus herpès simplex I recombinant neurovirulent à partir de la souche clinique H25, à l'aide du système CRISPR/Cas9. Nous avons ensuite utilisé ce virus recombinant exprimant la protéine fluorescente tdTomato et l'enzyme bioluminescente *Gussia Luciférase* (Gluc) pour 1) déterminer les régions infectées, 2) estimer les titres viraux sans sacrifier l'animal 2) évaluer l'efficacité du valacyclovir et 3) étudier la perturbation de la barrière hémato-encéphalique, à l'aide de système d'imagerie *in vivo* (IVIS). J'ai écrit le manuscrit, réalisé toutes les expériences. Julie Carbonneau et Marie-Christine Venable m'ont offert de l'aide technique dans la réalisation des différentes parties expérimentales. Pier-Luc Plante de l'équipe du Dr Jacques Corbeil, a réalisé les analyses bio-informatiques. Il a aussi participé à l'écriture d'une partie du manuscrit où les résultats des analyses bio-informatiques sont décrits. Quant aux Dre Piret et Dr Boivin, ils ont supervisé le projet de recherche ainsi que corrigé le manuscrit. Dr Jacques Corbeil a aussi corrigé le manuscrit.

PMID: 34548521 - DOI: [10.1038/s41598-021-98047-z](https://doi.org/10.1038/s41598-021-98047-z)

Le chapitre III correspond à un article « **An Early Microglial Response Is Needed To Efficiently Control Herpes Simplex Virus Encephalitis** » dont je suis le premier auteur

et qui a été publié dans la revue « *Journal of Virology* » le 9 Novembre 2020, et aucune modification a été apportée dans le texte inséré dans la présente thèse. Dans le cadre de ce manuscrit, nous avons d'abord étudié l'effet du traitement M-CSF ciblant la microglie et les monocytes/macrophages dans l'encéphalite herpétique expérimentale. Dans la deuxième partie de ce manuscrit, l'impact de la déplétion microgliale sur le contrôle de cette infection a été évalué. J'ai écrit le manuscrit, avec l'aide de Dre Piret. J'ai réalisé toutes les expériences. Marie-Christine Venable et Julie Carbonneau m'ont offert de l'aide technique dans la réalisation des différentes parties expérimentales. Nataly Laflamme de l'équipe du Dr Serge Rivest m'a aidé pour certaines expériences et a également participé à la coordination de ce projet. Quant aux Dr Serge Rivest, Dre Piret et Dr Boivin, ils ont supervisé le projet de recherche ainsi que corrigé le manuscrit.

PMID: 32938766 - DOI: [10.1128/JVI.01428-20](https://doi.org/10.1128/JVI.01428-20)

Le chapitre IV correspond à un article « **Single-cell transcriptomics of the ventral posterolateral nucleus-enriched thalamic regions from HSV-1-infected mice reveal a novel microglia/microglia-like transcriptional response** » dont je suis le co-premier auteur avec Juan Manuel Dominguez et qui a été publié dans la revue « *Journal of Neuroinflammation* » le 6 Avril 2022, et aucune modification a été apportée dans le texte inséré dans la présente thèse. Dans le cadre de ce manuscrit, nous avons caractérisé le rôle des microglies situées dans le noyau postéro-ventral des souris au pic de de l'infection du SNC par le virus herpès simplex 1, à l'aide de deux différentes approches qui sont la microscopie électronique et le séquençage d'une cellule unique. Nous avons montré que les microglies participent au contrôle de l'infection via les mécanismes comme la phagocytose et la présentation d'antigène. Une partie de ces cellules se font infectées par le virus herpès simplex 1 et se mettent à sécréter des cytokines pro-inflammatoires, telles IL-1B et TNF- α . D'après nos résultats, nous supposons que ces microglies infectées participent à la détérioration du pronostic de l'encéphalite herpétique expérimentale. Nous avons réalisé ce projet en collaborant avec les équipes du Dr Jacques Corbeil, de la Dre Marie-Ève Tremblay et du Dr Luc Vallières. J'ai écrit le manuscrit, et participé à la réalisation de toutes les expériences. Juan Manuel Dominguez a réalisé les analyses bio-informatiques et a rédigé une

partie du manuscrit de la section « *Materials and Methods* ». Lina Lapeyre m'a aidé pour les marquages en immunofluorescence. Maude Bordeleau et Fernando González Ibáñez de l'équipe de Dre Marie-Ève Tremblay, ont réalisé l'acquisition et les analyses des images en microscopie électronique. Ils ont également rédigé une partie du manuscrit de la section « *Materials and Methods* ». Dr Luc Vallières m'a encadré pour les analyses des séquences obtenues du séquençage d'une cellule unique. Quant aux Dr Boivin, Dr Jacques Corbeil, Dre Marie-Ève Tremblay, ils ont supervisé le projet de recherche ainsi que corrigé le manuscrit. Dr Luc Vallières, Dre Maude Bordeleau et Fernando González Ibáñez ont aussi corrigé le manuscrit.

PMID: 35387656 - DOI: [10.1186/s12974-022-02437-7](https://doi.org/10.1186/s12974-022-02437-7)

Introduction

Section-I : L'aspect virologique de l'EH

1. La description générale des virus herpétiques

L'Homme et les virus herpétiques coexistent depuis toujours. Le mot grec « *herpes* » signifiant « *rampier* », a été introduit pour la première fois dans les anciens documents de Grèce antique, afin de décrire des diverses lésions qui s'étaient sur la peau. Ce terme « *herpes* » a ensuite apparu dans le Canon d'Hippocrate. Le médecin romain, Herodotus, était le premier à décrire les éruptions cutanées labiales causées potentiellement par le VHS. Plus tard, au vingtième siècle, Vidal a identifié la propriété infectieuse du VHS, en transmettant l'infection d'un humain à un autre. Ainsi, Gruter a réussi à isoler certains virus herpétiques et a mis en évidence la nature infectieuse du VHS dans des expériences animales (1, 2).

Les virus herpétiques partagent plusieurs points communs morphologiques. Les virions font environ 200 nanomètres de taille. Ils possèdent un acide désoxyribonucléique (ADN) de poids moléculaire élevé, variant entre 124-295 kilos pairs de bases (kpb), codant approximativement pour 70 à 170 protéines, dans la capsid. L'ensemble du matériel génétique et la capsid, nommé « *nucléocapsid* », baigne dans le tégument qui est entouré d'une couche bilipidique, l'enveloppe portant des glycoprotéines qui permettent l'attachement à la cellule de l'hôte (3).

Auparavant, une grande multitude de virus ayant différents hôtes ont été classés ensemble, en fonction de leurs similitudes architecturales, sous l'ordre d'Herpesvirales. Aujourd'hui, grâce à la nouvelle approche taxonomique basée sur la génomique, les virus herpétiques sont divisés en trois familles sous l'ordre d'Herpesvirales : les Herpesviridae (hôte : les mammifères, les oiseaux et les reptiles), les Alloherpesviridae (hôte : les poissons et les amphibiens) et les Malacoherpesviridae (hôte : les mollusques). À l'heure actuelle, plus de 200 différentes espèces de virus herpétiques infectant une grande variété d'organismes incluant les vertébrés et les invertébrés ont été découvertes et ensuite regroupées dans ces trois familles par le comité international de taxonomie des virus (ICTV) (4).

Au premier regard, ces virus, capables d'établir une latence chez leurs hôtes, semblent loin d'être un danger grave pour la santé humaine. Cependant, plusieurs années de recherche nous ont permis à démontrer qu'ils sont potentiellement responsables de plus qu'une lésion cutanée banale. Aujourd'hui, on sait qu'il existe plusieurs virus infectant l'humain dans la famille des Herpesviridae. Chaque membre de cette famille cause directement ou indirectement diverses pathologies chez l'Homme (5).

Avec l'espérance de vie humaine qui augmente, la recherche sur les maladies neurodégénératives a gagné plus d'importance. Des travaux ont trouvé un lien potentiel entre ces pathologies neurologiques et certains des virus herpétiques. Actuellement, ces pathogènes se trouvent dans les premiers rangs de la liste des organismes associés à des maladies neurodégénératives, comme la sclérose en plaques (SP) ou bien la maladie d'Alzheimer (MA) (6). Ces résultats ont encore une fois montré la nécessité d'une meilleure compréhension de ces virus pour trouver des traitements à différentes maladies non initialement reliées.

2. Les virus herpétiques infectant l'humain

La famille Herpesviridae comprend plus de 100 virus herpétiques incluant les virus herpétiques humains (HHV pour « *human herpes virus* »). Dans ce groupe de virus, il y a 9 virus herpétiques qui infectent exclusivement l'humain : les virus herpès simplex 1 (VHS-1 ou HHV-1) et 2 (VHS-2 ou HHV-2), le virus de la varicelle-zona (VVZ ou HHV-3), le virus Epstein-Barr (EBV ou HHV-4), le cytomégalovirus (CMV ou HHV-5), les virus herpès 6a, 6b et 7 (HHV-6 et HHV-7) ainsi que le HHV-8 associé au sarcome de Kaposi. Il existe un neuvième virus, Cercopithecoid herpesvirus 1 (aussi appelé virus B) dont l'humain devient un hôte dans le cas où il entre en contact direct avec le singe infecté.

Ces HHVs partagent quatre propriétés biologiques communes (3):

- 1) Toutes les enzymes nécessaires pour la production des particules virales incluant les enzymes impliquées dans la biosynthèse des acides nucléiques viraux, sont codées à partir de l'ADN viral.
- 2) La duplication de l'ADN viral et l'assemblage de la capside se déroulent dans le noyau de la cellule infectée. L'assemblage final se termine dans le cytoplasme.

- 3) Le relargage des nouveaux virions est souvent accompagné par la mort cellulaire.
- 4) Chaque membre de la famille des HHV a un tropisme spécial pour certains types cellulaires et chacun de ces virus est capable d'établir un état de latence dans ces cellules.

2.1. La mode de transmission des Herpesviridae humains

Pour les virus du genre Simplexvirus, le VHS-1 et le VHS-2, il existe différents modes de transmission selon le type du virus. Pour les deux virus, la transmission nécessite le contact direct d'une lésion avec des sécrétions biologiques contenant les virions. La rupture de l'épithélium est très facile et reste souvent indétectable, ce qui augmente fortement la possibilité d'être infecté par les VHS. Bien que ces virus survivent sur des surfaces pendant environ deux heures, la probabilité d'une contamination indirecte à partir d'une surface souillée reste faible (7-9).

La primo-infection par le VHS-1 se produit majoritairement au niveau de la muqueuse de la cavité orale. Dans la majorité des cas, le mode de transmission est la salive. Le VHS-2 est principalement associé aux infections génitales. Les contacts sexuels sont acceptés comme la principale voie de transmission. En revanche, les cas de transmissions orogénitales augmentent dus aux changements dans les pratiques sexuelles. Aujourd'hui, on sait que les deux VHS peuvent être transmis de la mère à l'enfant durant la grossesse *in utero*, pendant ou après l'accouchement, ce qui soutient la possibilité de transmission verticale. Les cellules de la muqueuse, formant une barrière mécanique, seront lysées par les virus herpes simplex afin que ces derniers puissent accéder aux tissus plus profonds où ils établiront une infection latente dans les nerfs sensitifs (10-12).

Contrairement aux autres VHS de la même sous-famille, le VVZ du genre Varicellovirus, responsable de la varicelle, est très contagieux par voie aérienne. À l'état actif, le VVZ provoque des lésions cutanées contagieuses sous forme de vésicules. Le contact direct avec ces dernières, contenant en effet de nouveaux virions, permet la transmission du virus. La réactivation de ce virus des années plus tard entraîne le zona (13).

Il existe une multitude de voies de transmission pour les virus de la sous-famille Betaherpesvirinae. Le CMV se transmet principalement par la salive, mais également par les sécrétions génitales et le sang. Les glandes salivaires sont les sites majeurs de la réplication

virale. Les virions peuvent être retrouvés dans le lait maternel et dans les urines des personnes infectées. Le CMV persiste dans les cellules endothéliales et les monocytes-macrophages, ce qui rend d'autres modes de transmission possible, comme la transplantation d'organes ou bien la transfusion sanguine (14, 15). Un autre genre dans cette sous-famille est le Roséolovirus comprenant le HHV-6 (6A et 6B) et le HHV-7. Les voies de transmission de ces virus sont très similaires à celles du CMV. La salive, les sécrétions génitales et le lait maternel restent toujours les principaux véhicules assurant la transmission. Le virus persiste dans le sang, souvent en état de latence dans les cellules immunitaires infectées, comme les lymphocytes T (LT), ce qui rend encore les transplantations d'organe un moyen de contamination. De plus, Le HHV-6 a le privilège d'avoir un mécanisme d'intégration de son génome dans le chromosome de l'hôte afin d'établir la latence (16).

Les deux virus, potentiellement oncogènes, appartenant à la sous-famille de Gammaherpesvirinae, l'EBV (HHV-4) et le HHV-8, sont aussi transmis par la salive, ainsi que par les sécrétions génitales. Le HHV-4 utilise les lymphocytes B (LBs) afin d'établir la latence. Cependant, pour le HHV-8 responsable du sarcome de Kaposi, il existe plusieurs cibles potentielles, comme les cellules endothéliales. Il y a certaines incertitudes autour du sujet (17).

2.2. La taxonomie et la phylogénie des Herpesviridae humains

D'après les études phylogénétiques, il est probable que les virus herpétiques aient un ancêtre commun qui a existé avant le premier vertébré. Plus tard, il y a 180 à 220 millions d'années, les trois sous-familles de virus herpétiques ont divergé. Ces sous-familles ont été catégorisées sous les noms des Alpha-, Béta- et Gamma-herpesvirinae, en fonction de leurs propriétés biologiques (ex. : tropismes cellulaires, la durée du cycle répliquative virale, etc.) à partir de la famille des Herpesviridae (18, 19).

Cette classification des virus, qui a été faite avant la technologie génomique, en sous-familles en fonction de leurs propriétés biologiques, est acceptée comme une grande réussite. Cette famille de virus comprend au moins 120 différentes espèces de virus herpétiques, capables d'infecter une grande variété d'hôtes. Chaque virus est spécifique à son hôte qui est continuellement exposé aux multiples espèces d'Herpesviridae au cours de sa vie. Avec la nouvelle ère de la génomique, la classification a été mise à jour et perfectionnée en fonction

de la ressemblance, de l'arrangement de leurs génomes et des caractéristiques immunogènes des protéines virales. À présent, ces trois sous-familles regroupant les neufs HHVs sont toujours valides d'après les données récentes du ICTV (**Tableau-I**) (2, 20-22).

Tableau-I : Taxonomie des Herpesviridae infectant l'humain

<u>Sous-famille</u> <u>Genre</u>	<u>Séroprévalence</u>	<u>Site de latence</u>	<u>Manifestations cliniques</u>
<u>Alphaherpesvirinae</u>			
<u>Simplexvirus</u>			
HHV-1 (VHS-1): α-herpès virus humain de type 1	50*	- Neurones - Nerfs sensitifs - Ganglions trijumeaux	- Infections oropharyngées - Infections cérébrales (encéphalite) - Kératite
HHV-2 (VHS-2): α-herpès virus humain de type 2	25*	- Neurones - Ganglions trijumeaux - Ganglions sacrés	- Infections oropharyngées - Infections génitales - Infections néonatales - Infections cérébrales (encéphalite et méningite)
<u>Varicellovirus</u>			
HHV-3 (VZV): α-herpès virus humain de type 3	90 - 100	- Neurones - Nerfs crâniens - Ganglions dorsaux	- Varicelle - Zona
<u>Betaherpesvirinae</u>			
<u>Cytomégalovirus</u>			
HHV-5 (CMV): β-herpès virus humain de type 5	50*	- Cellules endothéliales - Cellules hématopoïétiques - Muscles lisses - Épithélium des glandes salivaires	- Syndrome mononucléosique - Rétinite - Encéphalite chez le fœtus - Pneumonie - Hépatite
<u>Roséolovirus</u>			
HHV-6A, 6B et 7 : β-herpès virus humain de type 6A, 6B et 7	90 - 100	- Lymphocytes T CD4 - Cellules myéloïdes progénitrices - Épithélium des glandes salivaires - Poumons - Monocytes (HHV-6A et 6B)	- Roséole - Pneumonie - Syndrome mononucléosique - Hépatite (HHV-6A) - Encéphalite (HHV-6A, B et 7)
<u>Gammaherpesvirinae</u>			
<u>Lymphocryptovirus</u>			
HHV-4 (EBV): γ-herpès virus humain de type 4	75*	- Lymphocytes B	- Mononucléose - Lymphome de Burkitt - Carcinome nasopharyngé
<u>Rhadinovirus</u>			
HHV-8 : γ-herpès virus humain de type 8	<10**	- Lymphocytes B - Cellules endothéliales	- Maladie de Castleman - Lymphome des cavités corporelles - Sarcome de Kaposi

Adapté de (5, 23) : La classification, la séroprévalence, les sites de latence des virus et les principales manifestations cliniques des Herpesviridae humains. *Dans certaines régions des pays en voie de développement, la séroprévalence peut atteindre 90-100 % de la population. ** La séroprévalence peut atteindre 50 % en fonction des régions.

3. Le VHS-1

3.1. Les structures

3.1.1. Le génome viral

Les Herpesviridae possèdent un des plus grands génomes viraux. Le VHS-1 contient un ADN double brin d'une seule copie, non fragmenté, ayant un poids moléculaire autour de 150 kpb. Sa composition en acides nucléiques est particulière, avec 68% du génome composé de Guanine (G) + Cytosine (C). Le génome se situe au centre de la particule, que l'on appelle le noyau, sous forme linéaire. Après l'infection de la cellule par le VHS-1, le génome rentre dans le noyau de la cellule où il sera circularisé en absence de la synthèse protéique (24, 25).

L'ADN viral est organisé sous forme de deux segments liés de façon covalente qui sont nommés, le segment « *unique long* » (U_L) et le segment « *unique short* » (U_S). Des extrémités inversées et répétées de ces deux segments jouent un grand rôle pour les recombinaisons au niveau du génome viral et sont essentielles pour la réplication du VHS-1 *in vivo*. Lors de la réplication du virus, ces segments peuvent être inversés, séparément ou simultanément, changer leur orientation, donnant ainsi la possibilité de 4 isomères linéaires présents en concentration équimolaire. Tous ces isomères sont fonctionnels et capables de se répliquer indépendamment (26-29) (**Figure-1**).

L'ADN viral, ayant au moins 77 cadres de lecture ouverts (ORF pour « *open reading frame* »), code au minimum pour 90 unités transcriptionnelles dont 84 correspondent à des protéines virales (VP pour « *viral proteins* »). Les gènes codant ces protéines peuvent s'orienter dans les deux sens et se trouvent sur les deux brins. Chacun des gènes se transcrit sous contrôle de leur propre promoteur. Ils sont classés en fonction de leur cinétique d'expression en trois familles : Les gènes- α pour les gènes immédiats précoces (2 à 4 h suivant l'infection), les gènes- β pour les gènes immédiats (4 à 8 h suivant l'infection) et les gènes- γ pour les gènes tardifs (> 8 h post-infection). À l'exception des gènes « *infected cell protein* » (ICP) 0 (a0) et ICP4 (a4), présents en deux copies dans les régions répétées, les gènes- α ne sont présents qu'en une seule copie dans les extrémités des segments U_L et U_S . Sauf quelques gènes exceptionnels, le reste appartenant aux familles de gènes- β et $-\gamma$ se trouvent dispersés sur les deux segments du génome du VHS-1 et se présentent aussi en une seule copie (30-32).

Sur le génome du VHS-1, il existe 3 origines de réplication, composées de séquences palindromiques, dont une copie (OriL) se situe au milieu du U_L et deux copies (OriS) dans les régions répétées des extrémités d'U_S. Ces origines de réplifications riches en Adénine (A) et Thymidine (T) ont une grande affinité envers la protéine virale UL9 (« *origin-binding protein* ») qui participe à l'initiation de la réplication qui se passe, en continu, sous forme de cercle roulant (33-35).

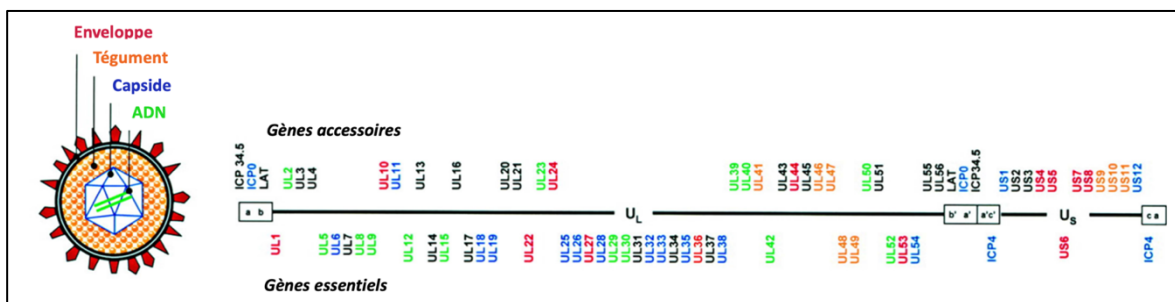


Figure-1 : Illustration schématique de l'organisation du génome et des principaux composants structurels du VHS-1.

Adapté de (36) : Les quatre principaux composants structurels de la particule virale sont présentés en différentes couleurs (à gauche). Le composant structurel et les gènes codant pour ce composant ont la même couleur (Code couleur : bleu = empaquetage de capside et d'ADN ; rouge = enveloppe ; orange = tégument ; vert = réplication de l'ADN et noir = autres fonctions). Le schéma du génome du HSV montre les segments long (U_L) et court (U_S) entourés des séquences répétées (à droite). Les noms des gènes non-essentiels et essentiels pour la réplication du VHS-1 en culture tissulaire sont situés en haut et en bas, respectivement.

3.1.2. La capside

L'ADN du VHS-1 se trouve dans une structure protéique, de forme icosaédrique, composée majoritairement de la « *major herpes simplex virus type 1 capsid protein* » (VP5 ou UL19) et trois autres protéines virales principales : VP26, VP23 et VP19C. Le VHS-1 possède une capside avec un diamètre de 125 nm. Comme tous les virus herpétiques, sa capside est composée de 162 structures protéiques, appelées capsomères. Il existe 3 types de capsomères : 150 hexagonaux, 11 pentagonaux et un portail protéique icosaédrique,

assemblés sous une conformation T=16 (T : Le nombre de triangulation indiquant le nombre d'unités structurelles par icosaèdre), qui fait une taille totale de 100 - 110 nm.

Les hexons et les pentons contiennent six et cinq unités de VP5, respectivement. Les capsomères hexagonaux contiennent aussi six VP26 formant un anneau, aux extrémités distales (sur les pointes de VP5). Ils forment vingt faces de la particule. Les pentons s'assemblent pour constituer les douze sommets, donnant la forme icosaédrique à la capsid. Un de ces douze sommets, composé de douze protéines de pUL6 qui est une protéine du tégument, constitue le portail par lequel l'ADN viral est encapsidé.

Tous ces trois éléments de la capsid sont connectés entre eux, par 320 triplex protéiques, composés d'une molécule de VP19C et deux molécules de VP23. Ces triplex sont des petites molécules protéiques, très compactes. Elles se trouvent attachées à la surface de la capsid et se lient également aux protéines de soutien UL25 et UL17, qui font un pont entre les capsomères. Il existe un dernier composant de la capsid, qui est la protéase VP24. Cette protéine joue un rôle dans le clivage des protéines d'échafaudages durant la maturation de la capsid. Cependant, sa localisation et sa fonction exacte restent à étudier (37, 38).

3.1.3. Le tégument

Le tégument fait partie des quatre éléments formant la particule virale. Ce compartiment, occupé par une substance amorphe, sépare la nucléocapsid de l'enveloppe chez les virus herpétiques. Chez le VHS-1, elle représente les deux tiers du volume total et 40% de la masse protéique du virion.

Actuellement, on sait que le tégument contient au moins 23 protéines virales qui couvrent une multitude de fonctions. En plus de ces protéines codées par le virus, plusieurs autres protéines appartenant à la cellule hôte, comme des enzymes, des protéines chaperons et d'autres protéines structurales (ex. : actines), sont retrouvées dans le tégument. Ces protéines s'accumulent soit dans la phase interne, soit externe du tégument, en fonction de leurs affinités avec la nucléocapsid ou l'enveloppe, respectivement. Ainsi, il a été rapporté que des virions purifiés pouvaient contenir des transcrits cellulaires au sein du tégument (39).

Les protéines les plus abondantes de ce compartiment sont : pUL47/VP13-14, pUL48/VP16 et pUL49/VP22, ayant un nombre de copies entre 600 et 1300. Les poids

moléculaires de ces protéines peuvent varier entre 10 et 300 kDa (kiloDalton). Certaines d'entre elles sont indispensables pour la formation des particules, d'autres sont dispensables. Plusieurs de ces protéines sont impliquées dans différents processus viraux, tels que l'initiation de la réplication (par exemple, « *α -trans-inducing factor* » (α -TIF), (connue sous le nom de VP16 ou UL48)), l'inhibition des mécanismes traductionnels de la cellule infectée (vhs (pour « *virus host shutoff* ») ou UL41)), le transport de la capsidie vers le noyau, l'assemblage viral, etc. (40, 41).

3.1.4. L'enveloppe

La nucléocapsidie et le tégument sont entourés par l'enveloppe qui est constituée de deux couches bilipidiques de 200 nm de diamètre. Elle est formée d'un ensemble de glycoprotéines virales et des membranes de la cellule hôte. Les glycoprotéines retrouvées sur l'enveloppe ne sont pas cruciales pour l'assemblage de la particule virale, mais restent primordiales pour l'infectiosité. Certains des molécules retrouvées dans l'enveloppe proviennent de la cellule hôte et modulent la réponse immunitaire durant le premier contact du virus avec son hôte (2).

Le VHS-1 code pour 20 glycoprotéines, dont 12 ou voire plus se trouvent sur l'enveloppe. Les glycoprotéines de surface (glycoprotéine B (gB), C (gC), D (gD), jusqu'à N) assurent plusieurs fonctions telles que l'attachement et l'entrée du virus dans la cellule hôte. Par exemple, gC (UL44) facilite l'attachement du virus. Plusieurs autres glycoprotéines de surface (gL (UL1), gH (UL22), gB (UL26) et gD (Us6)) aident à la pénétration du virus dans la cellule hôte. Elles peuvent même participer à la propagation du virus par l'utilisation d'un hétérodimère composé de gI (US7) et gE (US8) qui peut lier la portion du fragment cristallisable (Fc) de l'immunoglobuline G (IgG) et faciliter la propagation de cellule à cellule (29, 42).

Il a été démontré que l'enveloppe contient différentes sortes de lipides de diverses provenances. Aujourd'hui, on sait que l'enveloppe se crée en plusieurs phases, de l'enveloppement et du développement durant la migration de la particule du noyau vers l'extérieur de la cellule hôte. La nucléocapsidie du virion, assemblée dans le noyau de la cellule infectée, s'entoure en premier de la double membrane du noyau. La nucléocapsidie

enveloppée continue ensuite à migrer en passant soit par des endosomes ou des appareils de Golgi, d'où sa deuxième couche se forme (32, 43).

3.2. La réplication virale

Tout commence avec le VHS-1 qui se lie aux molécules de sulfate d'héparane (SH) sur la membrane cellulaire de l'hôte (**Figure-2**). L'attachement peut être facilité si la cellule hôte présente des filopodes (projections cytoplasmique) riches en filaments d'actine (44). Il a été montré que les ponts entre les cellules, formés de filopodes, peuvent favoriser le contact des virions extracellulaires avec une cellule non-infectée. Cependant, il y en a deux impliquées plus que les autres pour l'étape d'attachement : les gB et gC.

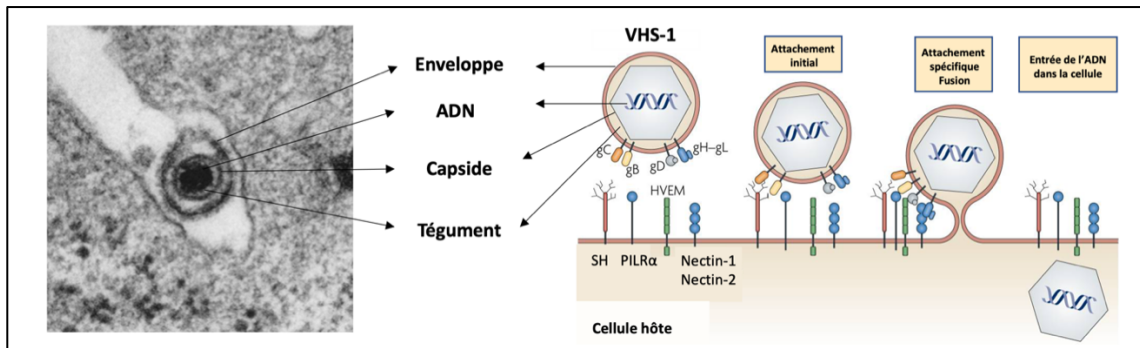


Figure-2 : Les glycoprotéines et les récepteurs d'entrée du VHS-1

Adapté de (45, 46) : L'image de microscopie électronique du VHS-1 montrant les quatre composants structurels de la particule virale. La capsid virale baigne dans le tégument et contient l'ADN viral. Les cinq glycoprotéines principales de surface impliquées dans l'entrée dans les cellules hôtes, gB, gC, gD, gH et gL, sont ancrées sur l'enveloppe externe. La première étape est la fixation des particules virales aux protéoglycanes du sulfate d'héparane (SH) sur la membrane de la cellule hôte, à l'aide de gB et gC. La liaison de gB au PILR α (pour « *paired immunoglobulin-like type 2 receptor- α* ») et la liaison de gD au HVEM, la Nectine-1 ou au SH déclenchent la fusion membranaire, qui est ensuite médiée par la gB et l'hétérodimère gH-gL. À la dernière étape, la nucléocapside est libérée dans le cytoplasme.

Une fois attachée, l'enveloppe de la particule commence à se fusionner avec la membrane de la cellule ou bien avec une vésicule intracellulaire (d'endocytose), à l'aide de gD, gB et gH (47). Les gB et gH, nécessaires pour la fusion, contiennent des domaines

protéiques fusogènes contrairement à la gD. Néanmoins, la gD, considérée comme un catalyseur, reste indispensable pour la fusion. On sait que l'adhésion du VHS-1 à la cellule est renforcée par la liaison de gD à son récepteur (48). D'après le modèle de fusion le plus couramment accepté, gD change sa conformation, une fois lié à son récepteur. Ce changement induit la formation d'un complexe multiprotéique constitué de gB, gD, gH et gL. Bien que les récepteurs de gD restent toujours à étudier, il en existe déjà plusieurs qui sont bien connus : les Nectin-1, 2, (de la famille des immunoglobulines), le HVEM (pour « *herpes virus entry mediator* ») et le 3-O SH (3-O sulfaté, sulfate d'héparane). La stratégie d'entrée dans la cellule peut dépendre du type de récepteur membranaire ciblé par le virion. Par exemple, l'interaction du gD avec la Nectin-1, induit l'endocytose des virions chez certains types cellulaires (**Figure-2**) (49).

Après la fusion de l'enveloppe avec la membrane, le tégument et la nucléocapside se retrouvent libres dans le cytoplasme de la cellule hôte. Par la suite, la plupart des protéines du tégument se dissocient de la nucléocapside et disparaissent. Une partie des protéines du tégument modulent le métabolisme cellulaire pour un meilleur rendement de l'infection. Certaines d'entre elles restent collées à la nucléocapside, et migrent vers le noyau. Des études *in vitro* montrent que l'ancrage de la capsidite sur la paroi nucléaire de la cellule requiert des protéines fonctionnelles du tégument. En absence de ces dernières, l'import de l'ADN viral vers le noyau est perturbé (50). Les protéines motrices assurent le transport antérograde (kinésine) et rétrograde (dynéine) de la capsidite. La liaison avec les dynéines cytoplasmiques permet à la nucléocapside de se faire transporter au long des microtubules vers le noyau. L'infection d'un neurone nécessite le transport par les microtubules. Néanmoins, il existe certaines cellules pour lesquelles les virions n'ont pas besoin de ce mécanisme (51, 52).

La nucléocapside du VHS-1 s'attache aux pores nucléaires qui se trouvent sur l'enveloppe nucléaire de la cellule. Cet ancrage est fait *via* l'importine- β faisant partie du pore nucléaire. Ces observations ont été confirmées par l'absence de liaison de la capsidite, en présence des anticorps anti-importine- β (50). De plus, on sait que l'inhibition des protéines pUL25 et pUL36 (protéines de la nucléocapside) empêche l'entrée du génome viral. L'ADN viral comprimé a été observé durant l'entrée au noyau. Les études suggèrent que la pression interne de la capsidite aide à l'éjection du matériel génétique. Les capsidites vides retrouvées

attachées sur la paroi nucléaire de la cellule infectée renforcent l'hypothèse d'éjection d'ADN dans le noyau. Cependant, les mécanismes exacts sont toujours à explorer (53).

Les gènes α du VHS-1 codent pour 6 protéines : ICP0, ICP4, ICP22, ICP27, ICP47 et US1.5. Ces gènes viraux ont leurs propres promoteurs et sont transcrits par l'ARN polymérase-II de l'hôte. Cette première étape se passe indépendamment de la synthèse protéique virale. La transcription des gènes- α est initiée par une protéine virale du tégment, codée par le gène UL48 : VP16. Avant, on pensait que cette protéine régulatrice était transportée au noyau par HCF-1 (pour « *Host cell factor C1* »). Cependant, VP16 a été retrouvée dans le noyau des cellules déplétées de HCF-1. Par la suite, il a été rapporté que VP16 est importée dans le noyau à l'aide de plusieurs protéines du tégment comme VP13, VP14 et VP22 (54). La VP16 induit la formation d'un complexe avec les deux protéines de la cellule, l'Oct-1 (pour « *Octamer transcription factor* ») et HCF-1, qui se lient sur les séquences régulatrices telles que les boîtes TATAs positionnées en amont du gène (éléments cis-régulateurs). Une fois que les ARNm des gènes- α sont traduits dans le cytoplasme, plusieurs protéines retournent dans le noyau afin d'initier la transcription des gènes- β et - γ . L'expression de ces derniers arrête la transcription des gènes- α (**Figure-3**).

L'expression des gènes- β et - γ exige la présence de certaines protéines codées par les gènes- α . Ces protéines sont impliquées dans différentes phases de la synthèse de l'ADN viral. La réplication de l'ADN viral a également un effet sur la régulation globale de la transcription des gènes. Dès le début de la réplication, les gènes précoces sont inhibés, alors que les gènes tardifs commencent à être activés.

L'ADN polymérase du virus codée par l'UL30 fait aussi partie des gènes- β . La protéine ICP4 fonctionnelle dite « *transactivatrice* » de la famille des gènes- α , est indispensable pour l'expression des gènes des familles - β et - γ , tout en activant ou en inhibant l'ARN polymérase-II de l'hôte. Sa forme régule l'expression des gènes- β , en se liant sur leur promoteur. Contrairement aux gènes- α , les autres familles de gènes ne contiennent pas d'élément régulateur contrôlé par le complexe VP16/Oct-1/HCF, dans leur promoteur. Un autre gène très connu de la famille β est UL23 codant pour la thymidine kinase (TK). Les études ont montré que ICP0 joue un rôle crucial dans la régulation de l'expression d'UL23.

Les gènes- γ , qui codent souvent pour les protéines structurales du virion (par exemple, VP5), sont régulés par plusieurs protéines des gènes- α et - β , comme ICP22 et ICP8, respectivement. Les produits de ces gènes sont aussi impliqués dans l'assemblage de la capsid. Cette famille est transcrite pendant et après la réplication virale. Pour ces gènes, on sait qu'il existe des ORF qui se chevauchent partiellement. La régulation de ces dernières se fait en fonction des différents signaux d'initiation ou de terminaison (55, 56). Durant la transcription, tous les ARNs sont exportés par le NXF1 (pour « *Nuclear RNA export factor 1* ») dans le cytoplasme. L'ARN viral est enfin traduit à l'aide de la machinerie traductionnelle de l'hôte (2, 8, 9).

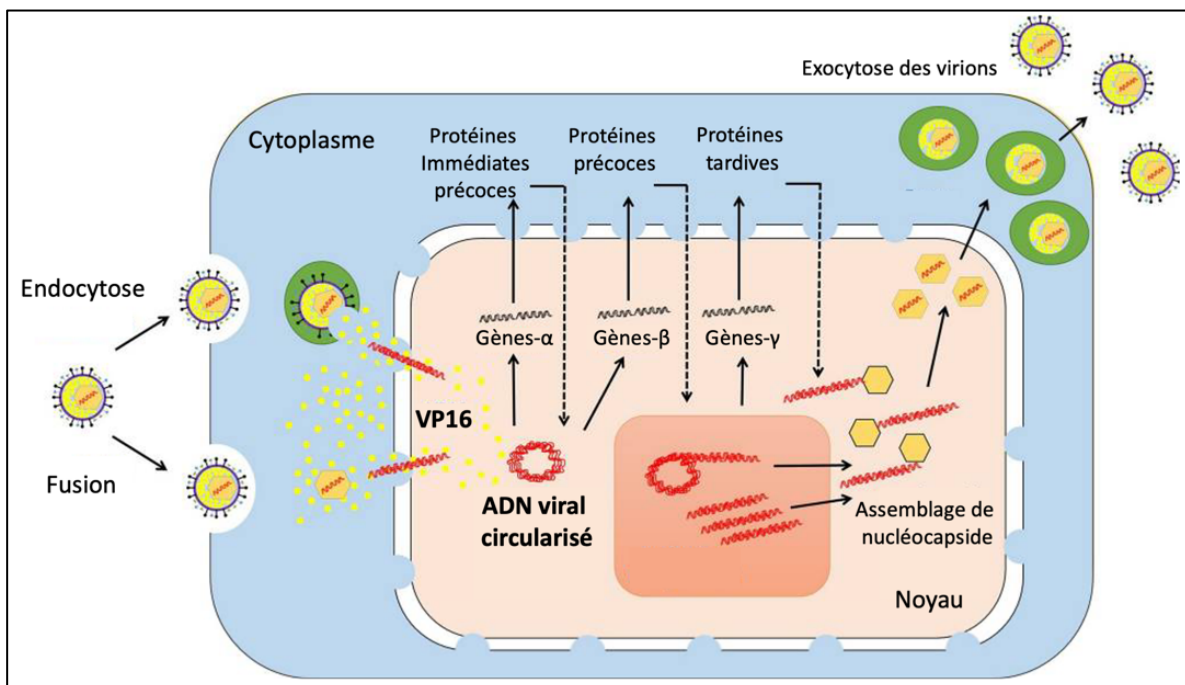


Figure-3 : Cycle de réplication du VHS-1

Adapté de (57) : Le virus se fixe via des glycoprotéines aux récepteurs cellulaires. Il pénètre la cellule *via* la fusion de l'enveloppe virale avec la membrane plasmique ou l'endocytose. La nucléocapside est transportée vers les pores nucléaires et l'ADN viral est éjecté dans le noyau. Les gènes viraux sont transcrits en cascade : Les gènes *immédiats précoces* (IE), *précoces* (E) et *tardifs* (L) sont exprimés dans l'ordre. L'expression des gènes IE est activée par la VP16. Les gènes E nécessitent la synthèse des protéines IE qui jouent un rôle essentiel dans le déclenchement de la réplication du génome viral. Les mécanismes

hypothétiques suggèrent que la réplication de l'ADN viral implique une réplication en conformation thêta, suivie d'une réplication en cercle roulant. L'expression de la protéine L dépend de la réplication du génome du VHS-1. Les étapes d'assemblage de la capsidite et d'insertion de l'ADN viral dans la capsidite se déroulent au noyau. La nucléocapsidite bourgeonne à travers la membrane nucléaire et est transportée à travers le cytoplasme pour aller fusionner avec la membrane plasmique. Au cours de ce voyage, la nucléocapsidite acquiert des protéines de tégument et d'enveloppe. Le cycle viral se termine par libération de virions.

3.2.1. La réplication de l'ADN

La réplication virale se fait sous forme épisomale qui signifie un ADN circularisé. La circularisation de l'ADN viral se passe immédiatement après l'entrée du génome dans le noyau. Le génome viral, positionné près du lamina nucléaire (LN), commence à interagir avec des protéines de l'hôte, afin de commencer l'expression des gènes nécessaires pour la réplication virale. Les protéines provenant des gènes- α interrompent certaines voies de signalisation cellulaire et aident à l'exploitation de protéines cellulaires, comme l'ARN polymérase II, qui transcrit les gènes viraux. Durant l'expression des gènes, comme décrit précédemment, la duplication de l'ADN commence (34, 58).

Cette étape nécessite 7 protéines virales dont les 6 qui constituent la fourche de la réplication d'ADN. La réplication commence avec la liaison de la protéine UL9 sur une séquence spécifique (-CGTTCGCACTT-) qui se trouve dans un des trois sites d'origine de réplication (OriS ou OriL). L'UL9 ayant une activité hélicase, elle change la configuration de double hélice et donne l'accès aux autres protéines pour qu'elles puissent répliquer l'ADN. Par la suite, la protéine ICP8 codée par UL29 (« *single-strand DNA-binding protein* ») est recrutée au niveau de la fourche de réplication, d'abord pour augmenter l'activité d'hélicase d'UL9, mais aussi pour stabiliser l'ADN simple brin. Ces deux protéines forment un complexe et interagissent avec un autre complexe protéique composé de UL5/UL8/UL52, que l'on appelle le complexe hélicase-primase. Ce dernier est essentiel pour l'ouverture de l'ADN viral double brin et pour la synthèse de courts fragments d'ARNs liant le simple brin, qui seront par la suite allongés par l'ADN polymérase virale. L'UL5 et 52 ayant une activité « *Adenosine 5'-TriPhosphatase* » (ATPase), jouent un grand rôle dans le

fonctionnement de ce complexe. L'UL8 a plutôt un rôle dans le maintien de l'interaction de ce complexe avec d'autres protéines virales impliquées dans la réplication et le recrutement de l'ADN polymérase. Cette dernière est accompagnée par UL42 (facteur de processivité) qui synthétise le brin complémentaire, à partir des petits fragments d'ADN. Les produits de réplication sont de longs concatémères de différentes orientations. Aujourd'hui, on sait bien qu'il existe une multitude de protéines du VHS-1 (par exemple, TK, ribonucléotide réductase et l'uracile N-glycosylase) et de la cellule hôte (par exemple, ADN ligase, topoisomérase II et l' α -primase) qui sont impliquées dans ce processus complexe (59-61) (**Figure-4**).

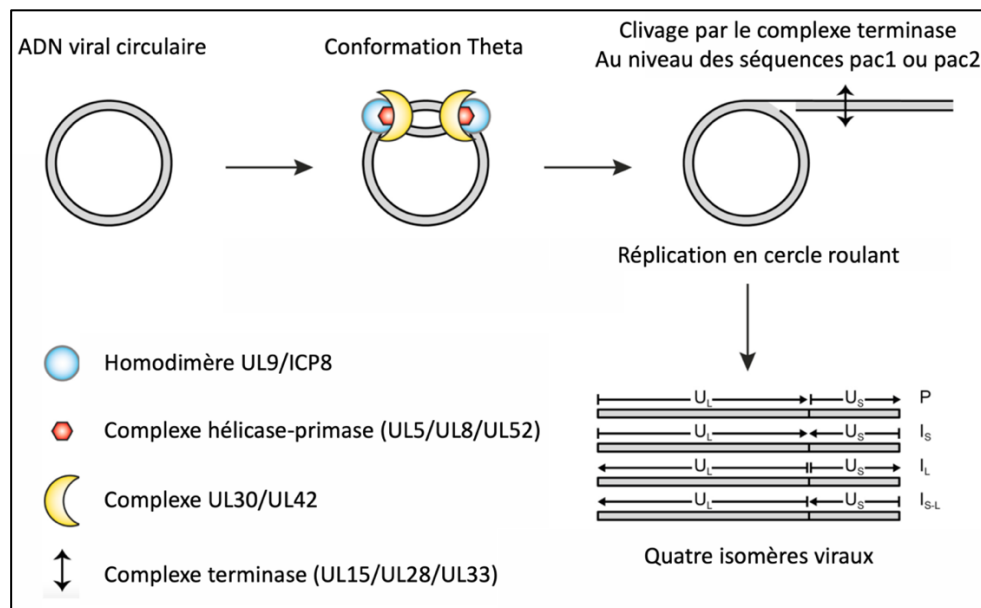


Figure-4 : Représentation schématique de la réplication des génomes du VHS-1

Adapté de (60): Après son entrée dans la cellule, l'ADN viral se circularise dans le noyau. L'homodimère d'UL9 initie la réplication de l'ADN en se liant à des séquences spécifiques à l'une des origines de réplication. L'ICP8 est recrutée pour renforcer l'activité hélicase d'UL9. Le complexe hélicase-primase est recruté avec l'ADN polymérase associée à son facteur de processivité (UL30-UL42). Les deux complexes s'assemblent à chaque fourche de réplication. La réplication de l'ADN viral se déroule sous forme thêta et continue en cercle roulant. La synthèse d'ADN viral aboutit à des concatémères qui sont clivés par le complexe terminase au niveau de deux séquences spécifiques agissant en cis (pac1 et pac2) localisées dans des séquences répétées « a ». Ces concatémères sont ensuite emballés dans des capsides préformées. Les séquences U_L et U_S orientées en différentes directions

aboutissent à la synthèse de quatre isomères viraux appelés : Prototype (P), U_S inversé (I_S), U_L inversé (I_L) et U_S et U_L inversés (I_{S-L})).

3.2.2. L'assemblage, l'encapsidation et le bourgeonnement

L'organisation du génome est de façon suivante : ab-UL-b'a'-a'c'-US-ca (a, b, c : des séquences inversées répétées). Durant la réplication en cercle roulant de l'ADN du VHS-1, les brins linéaires se font cliver à partir des séquences spécifiques, appelées pac1 et pac2, qui se trouvent dans la séquence répétée inversée se situant aux deux extrémités des segments UL et US. La protéine UL28 scanne l'intégralité de l'ADN viral pour ces séquences spéciales et donne le signal à pUL15 (activité endonucléase), pour le clivage du génome dès sa rencontre avec le site pac2. Par la suite, l'ADN clivé libre est transporté vers le portail de la capsid, composé de pUL6, par le complexe terminase composé de pUL15, pUL28, et pUL33. L'encapsidation est initiée à partir du segment UL et est terminée par le segment US (38, 62).

Il existe 4 formes de capsides : La procapside, la capsid -A, -B et -C. L'assemblage des protéines de la capsid est faite par des protéines d'échafaudage virales, telles que UL26.5, qui se font dégrader par la protéase virale, une fois que la capsid est prête pour l'entrée de l'ADN viral. Ces structures restent très similaires. Les procapsides produites durant l'infection, sont les précurseurs des autres trois formes et elles donnent naissance aux virions infectieux en se maturant. Il est largement accepté que la capsid C se différencie en virus infectieux. Les trois types de capsides produites dans le noyau au cours de l'infection, passent par les étapes d'enveloppement-développement et migrent vers le cytoplasme. Cependant la forme prédominante cytoplasmique reste celle de la C. La capsid A sans ADN et B contenant des protéines d'échafaudage non lysées, sont considérées des formes défectueuses. Comme la forme C, ces deux formes sont aussi libérées (63, 64). Il a été suggéré que la génération de particules virales défectueuses peut être impliquée dans l'échappement de la réponse immunitaire, en permettant aux formes matures d'infecter les cellules, pendant que les cellules immunitaires attaquent aux autres formes non-fonctionnelles. Cette théorie n'est plus acceptée. Au contraire, plusieurs études montrent que la production de ces formes non-fonctionnelles pourraient être hautement immunogènes et induire une activation de la réponse immunitaire de l'hôte (63).

Des essais *in vitro* ont montré qu'il faut au moins VP5, VP19C, VP23 et pré-VP22a ou pUL26 (activité protéase) pour la formation d'une capsidie ayant une bonne morphologie dans laquelle l'ADN serait encapsidé. De plus, il a été montré que pUL15, pUL28 et pUL33, qui sont des protéines impliquées dans l'assemblage des protéines de la capsidie, se trouvent fixées sur la procapsidie, avant l'encapsidation de l'ADN. Le dysfonctionnement ou l'absence d'une de ces protéines peut mener à une accumulation des capsides B. En absence de protéines UL25, une accumulation d'ADN clivé et de capsidie A, a été rapportée (65). L'ADN est délivré dans la capsidie à l'aide d'un ensemble de 7 protéines virales : UL6, UL15, UL17, UL25, UL28, UL32 et UL33. Toutes ces protéines, sauf UL25, jouent un rôle majeur dans le clivage de l'ADN, qui sera encapsidé par la suite à l'aide du complexe terminase composé de trois des sept protéines, tel que décrit précédemment (38, 66).

La dernière étape du cycle répliatif est la sortie des virions de la cellule. La nucléocapsidie se trouve sans enveloppe dans le cytoplasme. Vu l'absence de l'enveloppe dans le cytoplasme, il a été suggéré que la nucléocapsidie pourrait sortir directement par les pores nucléaires, sans passer par une étape d'enveloppement. Cependant cette hypothèse est la moins acceptée, car la nucléocapsidie est plus grande que le pore nucléaire. Une des deux hypothèses les plus acceptées est basée sur le transport des virions produits par le système d'exocytose. Il est connu que la nucléocapsidie acquiert sa première enveloppe en sortant du noyau contenant deux couches bilipidiques. Cependant, elle sort du noyau en perdant sa couche, qui fusionne avec la deuxième barrière extérieure du noyau. De plus, on sait actuellement que ce premier enveloppement par la paroi nucléaire interne se passe à l'aide de deux protéines virales : UL31 et UL34. L'acquisition d'une double enveloppe à la sortie du noyau était une des hypothèses sur l'origine de l'enveloppe. D'après cette dernière, la nucléocapsidie forme des vésicules qui sont transportées vers la membrane plasmique pour être relâchées. Cette hypothèse était ainsi supportée par les images de microscopie électronique. Pourtant, la composition de l'enveloppe reste loin de celle de la membrane cellulaire. À l'heure actuelle, la deuxième hypothèse reste largement acceptée avec la nucléocapsidie transportée à l'endosome et/ou à l'appareil de Golgi où les virus nouvellement enveloppés participent au circuit d'exocytose afin d'être relargués à l'extérieur de la cellule (38, 67-69) (**Figure-5**).

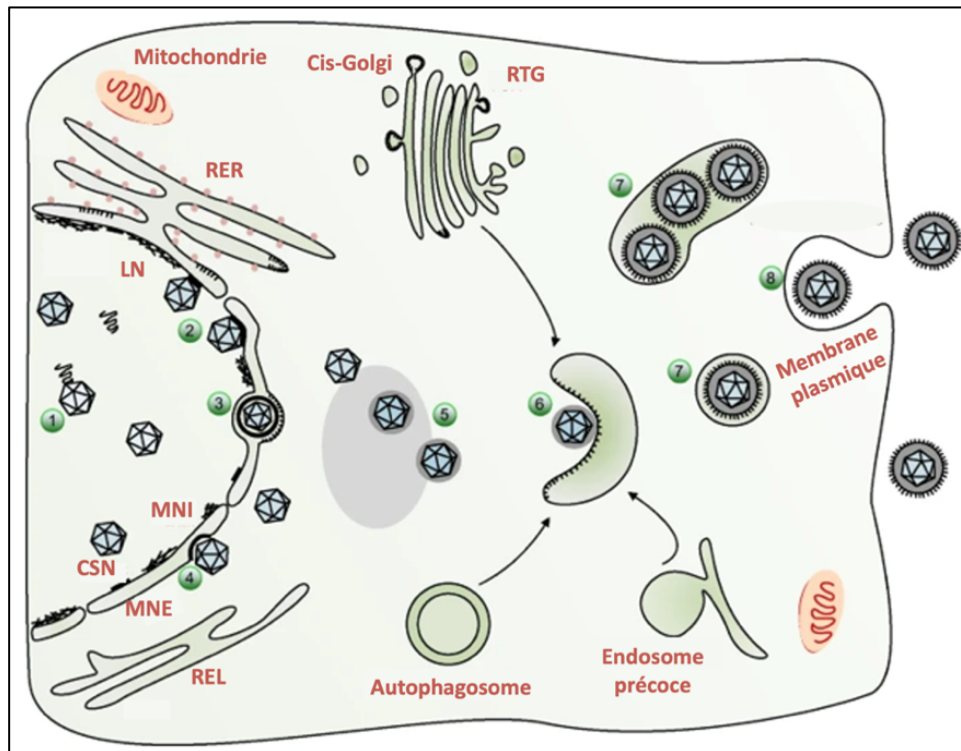


Figure-5 : La représentation schématique de l'assemblage et de la sortie du VHS-1

Adapté de (70) : 1 - Les génomes viraux sont injectés dans les capsides au noyau. 2 - Les nucléocapsides se dirigent vers la membrane nucléaire interne (MNI) où le complexe de sortie nucléaire (CSN) est ancré. La lamina nucléaire (LN) est perméabilisée par des kinases cellulaires ou virales pour permettre au CSN de sortir du noyau. 3 - L'enveloppe primaire est formée à partir de la MNI dans l'espace périnucléaire durant le bourgeoisement de la nucléocapside. 4 - Les nucléocapsides se libèrent dans le cytoplasme suite à la fusion de l'enveloppe primaire des virions avec la membrane nucléaire externe (MNE) (l'étape de désenveloppement). 5 - Dans le cytoplasme, les nucléocapsides acquièrent des protéines du tégment au niveau des endroits denses en électrons au microscope électronique. 6 - Les capsides avec les protéines du tégment bourgeoisent en vésicules spéciales qui peuvent être produites par le réseau trans-Golgien (RTG), l'endosome précoce (EE) ou de l'autophagosome, 7 - Les virions matures sont formés à l'intérieur de ces vésicules. Cette étape correspond à l'enveloppement secondaire. 8 - Ces vésicules fusionnent avec la membrane plasmique et libèrent des virions matures dans l'espace extracellulaire.

3.3. La latence

Le VHS-1 donne deux différentes sortes d'infections, en fonction de divers paramètres : soit une infection lytique, soit latente. Le terme « *latence* » est défini comme la conservation du génome viral sans production de particule virale. Les cellules épithéliales qui sont souvent les premières cellules à être infectées, résultent en infections lytiques assurant la production virale et l'expansion de l'infection. Le choix du type d'infection est fortement dépendant de la disponibilité de VP16 qui forme un complexe protéique avec l'Oct-1 et l'HCF-1, tel que décrit précédemment. Ce complexe régulant les histones acétyltransférases et les déméthylases, interagit avec les promoteurs des gènes viraux- α et active l'expression des protéines virales. Cette interaction empêche également la formation d'hétérochromatine, ce qui résulte en infection lytique (71) (**Figure-6**).

Les neurones sont des cellules « *réservoirs* » du VHS-1. Contrairement aux cellules épithéliales, on observe souvent chez les neurones un état de latence en trois phases : la phase d'établissement, la phase de maintenance et la phase de réactivation. À la suite du contact du VHS-1 avec les prolongations des neurones innervant l'épithélium, le virus neurotrope infecte les neurones et commence à voyager *via* les microtubules, par le transport rétrograde, jusqu'au corps cellulaire où il établit la latence, sous forme épisomale circulaire. Il a été suggéré que la disparition de VP16 durant la migration du virus vers le noyau, peut causer une infection latente. En effet, en absence de VP16, le génome viral acquiert une structure chromatinienne classique, dans laquelle les histones associées aux promoteurs des gènes lytiques sont dans une configuration répressive, empêchant l'expression des protéines- α . Cependant, l'établissement de la latence ne peut pas être expliqué uniquement par le défaut de recrutement de VP16 (72).

Durant cet état, on observe une forte expression du locus LAT (pour « *latency-associated transcripts* ») qui se localise dans la région inversée répétée entre l' U_L et l' U_S . Le locus LAT contient un promoteur neuro-spécifique, ce qui explique pourquoi la latence est observée particulièrement chez les neurones. Il code pour un ARN polyadénylé de 8.5 kb. Par la suite, trois ARNm de différentes tailles (2 kpb, 1.5 kpb et 1.45 kpb) contenant des introns stables et plusieurs microARN (miARN) résultent à partir de l'épissage de ce transcrit (73, 74).

À l'heure actuelle, on sait que les LATs ont deux rôles majeurs : inhiber les gènes viraux de famille- α et garder le neurone en vie en inhibant l'apoptose. Les mécanismes exacts exploités par le VHS-1 pour établir la latence restent toujours à étudier, mais il existe déjà plusieurs hypothèses. Par exemple, pour l'inhibition de la réplication, il a été suggéré que les LAT bloquent l'expression des gènes ICP0, ICP4 et ICP27, qui sont impliqués dans la réplication virale.

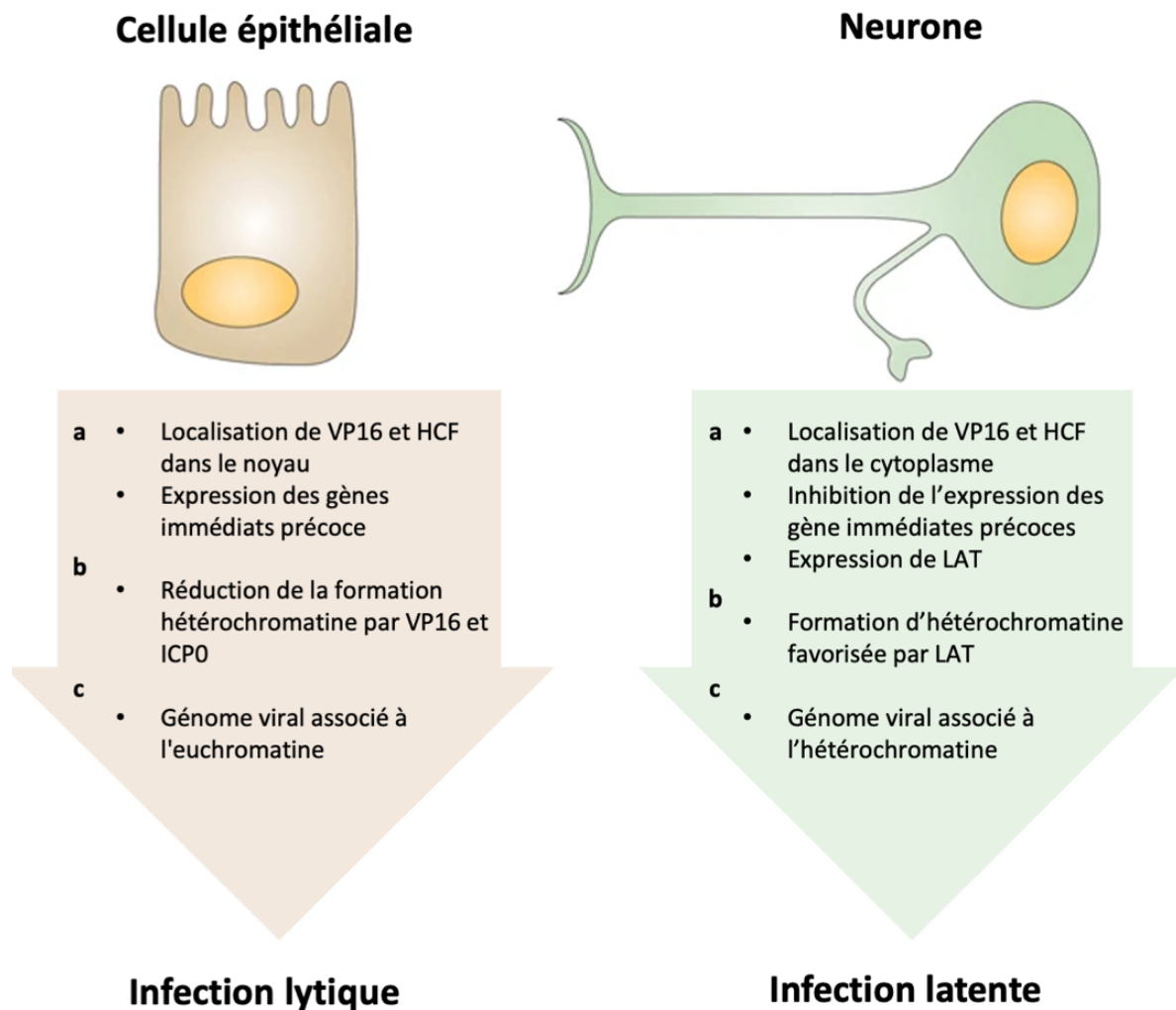


Figure-6 : Impact du VHS-1 sur l'organisation de la chromatine

Adapté de (75) : Les protéines virales ,VP16 et ICP0, et LAT affectent le remodelage de la chromatine qui favorise un des deux types d'infections : une infection lytique *versus* une infection latente.

Au début, on pensait qu'il existait un mécanisme de blocage anti-sens d'ARNm d'ICP0 par un des ARNs de LAT. Par la suite, les miARNs ont été cités comme étant responsables de cette inhibition d'expression des gènes lytiques. En ce qui concerne l'effet anti-apoptotique des LATs, il existe deux hypothèses : l'effet inhibiteur des LATs sur le cycle viral lytique protège la cellule de la mort, ou bien il y a un effet direct interférant avec les voies des caspases nécessaires pour induire l'apoptose. Il a été montré que les cellules transfectées avec des plasmides exprimant des séquences LATs étaient résistantes aux agents exogènes induisant l'apoptose (76).

Comme le VHS-1 peut rester silencieux durant toute la vie, la production de virions peut aussi être activée périodiquement par plusieurs sortes de stimuli, tels que le stress émotionnel, la fièvre, un dommage tissulaire, l'exposition aux UV, un changement hormonal ou bien l'immunosuppression. Durant la réactivation, le VHS-1 est produit dans les nerfs des ganglions trijumeaux (GT), qui est l'endroit principal de latence. Ensuite les virions migrent vers leurs sites de primo-infection et donnent des lésions invisibles à l'œil nu ou des lésions sévères. Le virus est capable de donner des infections dans d'autres sites que celui de la primo-infection, ce qui est le cas pour un tiers des cas d'EH (des infections du système nerveux central (SNC) par le VHS-1). Chez l'Homme, on observe des réactivations spontanées du virus, ce qui est très rare dans les modèles animaux. Le choc thermique est la méthode la plus couramment utilisée chez la souris pour induire la réactivation. Ce phénomène se produit en présence d'une immunité humorale et cellulaire efficaces. Les facteurs cellulaires indispensables pour la réactivation du virus restent globalement inconnus. Il a été quand même montré que, chez les neurones, l'activation préalable de VP16 reste l'élément essentiel pour l'induction de l'expression des gènes lytiques. Cependant la cause et le mécanisme derrière la réactivation de VP16 restent toujours inconnus. De plus, les premiers 1,5 kpb de la séquence des LATs donnent lieu à un miARN qui a été suggéré comme un élément essentiel pour permettre une réactivation (69, 77).

3.4. La neurovirulence

De l'aspect morphologique, jusqu'à leur interaction avec le système immunitaire, il existe une multitude de propriétés cellulaires qui rendent les neurones très différents des autres cellules. De plus, leur métabolisme cellulaire se distingue des autres cellules. Les virus

neurotropes restent peu nombreux et ont besoin de plusieurs facteurs qui leur permettent d'infecter les neurones que l'on appelle des facteurs de neurovirulences. Les mécanismes exacts sont toujours à étudier, mais il est connu qu'il faut une combinaison de différents facteurs viraux et aussi de la cellule hôte. Après avoir infecté des cellules épithéliales, le VHS-1 ayant un tropisme pour les neurones, gagne accès au SNC en infectant les neurones sensoriels *via* leurs terminus axonaux qui innervent la peau. L'immunité permet d'avoir un état de clairance virale où il n'y a plus de production de particules virales. Néanmoins, le virus ayant déjà infecté les neurones, il reste dormant souvent dans les nerfs trijumeaux (NT), grâce à son système de latence ainsi que grâce à certains immunoprivilèges neuronaux (ex. : une expression faible de CMH-I (complexe majeur d'histocompatibilité de type I)). Dans certains cas, le VHS-1 peut se réactiver et donner plusieurs pathologies très sévères comme des kératites et des encéphalites.

Le VHS-1 produit plusieurs enzymes comme la TK et la ribonucléotide réductase, altérant le métabolisme cellulaire. Ces enzymes participent à la production des virions chez les neurones, mais sont également nécessaires pour la neurovirulence. L'autre enzyme virale nécessaire pour la neurovirulence est dUTPase. Il a été montré que les mutants dUTPase négatifs, avec un défaut de réactivation, étaient en effet moins neurovirulents. Il est connu que cette enzyme atteint le niveau maximal durant la phase S de la division cellulaire. Cependant, les neurones, qui sont majoritairement des cellules qui ne se divisent pas, n'ont pas suffisamment de dUTPase produites, ce qui rend nécessaire la production de dUTPase virale durant l'infection, pour la production virale (78).

Le transport rétrograde est un élément crucial pour la neurovirulence. Récemment, certaines protéines du tégument du VHS-1, qui participent au transport rétrograde de la capsid vers le noyau *via* les microtubules de l'axone, ont été suggérées comme des facteurs de neurovirulence. La pUL36 et la pUL37 font partie de ces protéines. La pUL36 contient un domaine de désubiquitinase (DUB pour « *herpesvirus désubiquitinase* »), qui est indispensable pour plusieurs voies de régulation des protéines (ex. : les modifications post-traductionnelles, leur dégradation par le lysosome ou le protéasome, leur localisation intracellulaire, etc.). Il a été montré que l'ubiquitination et désubiquitination de la lysine à la position 422 de DUB (K442) modulent la neurovirulence. En absence d'ubiquitination de ce

site, le virus n'est plus capable de se faire transporter (79). De plus, le transport rétrograde a été perturbé par l'introduction de mutations dans la partie du génome codant pour une région de pUL37, ce qui valide son importance dans la neurovirulence (80). Une des protéines majeures du tégument, VP22, régulatrice de la localisation et l'expression de protéines virales, a été aussi montrée comme facteur candidat de neurovirulence (81).

Il y a un grand nombre de gènes dont leurs implications dans la neurovirulence sont actuellement sous étude. À l'heure actuelle, le rôle le plus important dans la neurovirulence est attribué au gène γ 34.5, présent en deux copies qui se situent dans les régions répétées bordant le segment UL. L'ICP34.5 est capable d'inhiber l'autophagie des cellules afin d'éviter l'arrêt de la synthèse protéique virale. La modification de ce gène induit une baisse du nombre de neurones infectés au VHS-1 autant chez la souris que chez l'humain. Contrairement à la situation *in vivo*, la réplication du virus mutant *in vitro* n'est pas affectée (82-84).

4. La transmission et la pathogenèse des VHS

Le premier contact physique d'une personne séronégative avec le virus, *via* une lésion cutanée, résulte en une primo-infection. Dans le contexte du VHS, les sécrétions de la personne infectée peuvent contenir des virions infectieux même si cette dernière est asymptomatique. La sévérité de la primo-infection est un des déterminants de la fréquence subséquente des réactivations que l'on appelle une infection « *récurrente* ». Dans le cas où quelqu'un contracte un autre type d'herpès virus en étant séropositif pour un des VHS, cela résulte à une infection « *initiale* » et non-primaire. Comme décrit précédemment, la transmission nécessite le contact avec les muqueuses infectées du patient (85).

Durant la primo-infection et l'infection récurrente, l'infection est souvent « *lytique* » et conduit à la mort cellulaire, accompagnée d'une forte réponse inflammatoire. Une condensation de la chromatine suivie de la dissolution et une fragmentation nucléaire (cellule nécrotique) est observée durant l'infection. La dernière étape qui est la rupture de la membrane cellulaire assure la libération des virions. La perte de la membrane mène à la formation de cellules géantes multinucléées, qui sont essentiellement formées par fusion d'autres cellules. Une étude a suggéré que le VHS-1 favorise la fusion des cellules voisines

afin de faciliter la transmission de cellule à cellule du VHS-1, ce qui rend sa détection impossible par les cellules immunitaires. Le gD représente un des composants viraux promouvant la fusion des cellules voisines avec les cellules infectées. La même glycoprotéine permet au VHS-1 de fusionner son enveloppe avec la membrane des endosomes dans les quelles il est situé suite a son endocytose. Cette fusion sert au virus à accéder au cytoplasme et infecter la cellule (86, 87). La lyse cellulaire libère un liquide vésiculaire contenant des virus et des débris cellulaires. Des vésicules sont formées entre le derme et l'épiderme (85, 88).

Les deux VHS partagent deux points communs : la neurovirulence et la capacité d'établir la latence. En général, le VHS-1 infecte la muqueuse oropharyngée et établit sa latence dans les GT. Le VHS-2, ayant un tropisme pour la muqueuse génitale, reste silencieux dans les ganglions sacrés. Cependant, le changement de site d'infection reste toujours possible et devient de plus en plus fréquent. Les virus herpétiques restent souvent dans le système nerveux périphérique (SNP). C'est rare que ces virus causent l'infection du SNC tel que l'encéphalite (2, 85, 89).

5. L'épidémiologie

5.1. L'épidémiologie des maladies liées aux infections aux VHS :

Les VHS sont répandus sur toute la terre. La latence, assurant une infection à vie, et la faible mortalité résultent en une prévalence de l'infection très élevée. Il est estimé que de 60 à 95% de la population mondiale est infectée par au moins un des deux VHS (90). La prévalence change en fonction de la localisation géographique, du statut socioéconomique, de l'âge et de l'ethnicité. En plus de ces derniers, les facteurs affectant le degré d'expositions aux VHS, comme la densité de la population et le manque de mesures d'hygiène affectent l'incidence et la prévalence de ces infections (91). Le risque de contamination est corrélé avec la charge virale transmise. Une personne symptomatique excrète plus de virions et contamine son entourage, bien que la plupart des transmissions sont réalisées par des personnes asymptomatiques qui excrètent quand même des virions.

Après 4 à 8 jours suivant la primo-infection, les patients commencent à développer des anticorps IgM contre le VHS et deviennent séropositifs. Entre 8 et 18 jours, on voit que

le niveau d'anticorps IgM et IgG dirigé contre le virus atteint un plateau. Les anticorps IgM perdurent environ 5 à 8 mois et parfois sont même détectables plus de 16 mois suivant l'infection. Dans des populations à faible revenu, on observe qu'un tiers des enfants deviennent séropositifs pour le VHS-1 avant l'âge de cinq ans. Cette fraction représente seulement 20% pour les enfants de la classe économique moyenne. La prévalence de l'infection au VHS-1 pour la population à faible revenu atteint 70 à 80% au début de l'adolescence. Au contraire, elle ne change pas pour les enfants de classe moyenne jusqu'à leurs 20 à 30 ans et atteint 40-60% pour les gens de cette classe économique (92). Les études sur des différentes ethnies montrent des différences pour la distribution des infections au VHS-1. Par exemple, aux États-Unis, 35% des enfants afro-américains sont séropositifs contre 18% des enfants blancs âgés de 5 ans (93).

La séroprévalence du VHS-1 est plus élevée que celle du VHS-2. 85 % des infections orolabiales sont causées par VHS-1 alors que seulement 15 % sont dues au VHS-2. À l'inverse, le VHS-2 est responsable de 60 à 70 % des infections génitales, tandis que le VHS-1 est responsable du reste. Étant donné que le VHS-2 est transmis *via* des rapports sexuels, le nombre des gens séropositifs avant la puberté est très faible. Comme pour le VHS-1, il existe plusieurs facteurs qui influencent la prévalence de l'infection au VHS-2. Pour les classes moyennes et les classes socio-économiques plus basses, la séroprévalence se situe autour de 15% et 40%, respectivement. Le niveau d'acquisition annuel est de 8% chez les femmes ; 4 fois plus élevé que chez les hommes (94). L'infection génitale par les VHS chez les femmes enceintes mérite l'attention à cause du grand risque de transmission aux nouveaux-nés durant l'accouchement et du risque d'infection du fœtus *in utero*, qui est rare mais létale pour le fœtus. Le risque de transmission du virus au nouveau-né se trouve autour de 30% à 50% dans le cas d'une primo-infection virale productive, acquise dans le dernier trimestre de la grossesse (95).

Des atteintes du système nerveux par les virus d'herpès simplex causent plusieurs différentes pathologies neurologiques. Une des formes les plus dangereuses causées par ces virus est la kératite. Dès l'âge de 6 semaines, on observe des enfants ayant des kératites herpétiques. Entre 40 et 60 ans, la prévalence atteint le niveau maximal. Les études étiologiques sur la maladie montrent que la cause majeure reste le VHS-1 chez les adultes et

le VHS-2 chez les nouveaux-nés. Comme décrit précédemment, une forte excrétion du VHS-2 chez la femme enceinte durant l'accouchement est à l'origine de cette pathologie. Cependant la raison majeure reste des infections récurrentes aux VHS, avec plus de 50% déclenchées par des traumatismes de l'œil, une opération intraoculaire ou bien une anesthésie générale (91, 96, 97).

Les personnes atteintes d'une infection génitale primaire aux VHS peuvent développer une méningite aseptique. Dans le cas d'une réactivation du virus, les mêmes patients atteints d'herpès génital peuvent avoir des méningites aseptiques récurrentes, dites « *méningite de Mollaret* ». En plus de la méningite, le VHS peut causer une myélite et une radiculite. Ces virus sont également responsables de l'EH, considérée comme la pathologie la plus grave causée par les VHS (98, 99).

5.1.1. L'épidémiologie de l'EH

Le terme encéphalite est utilisé afin de décrire l'inflammation du parenchyme du cerveau. 50% des encéphalites sont d'origine infectieuse et il existe plusieurs agents infectieux dont les VHS, qui provoquent une infection du SNC. Les VHS sont à l'origine de l'EH. Cependant, 90% des cas sont dus à une infection au VHS-1, à l'exception des EHs chez les nouveaux-nés qui sont majoritairement dues au VHS-2. L'incidence des EHs est 1 cas/250 000 individus. Bien que ce chiffre apparaisse faible, le VHS-1 reste responsable d'environ 75 % des cas d'hospitalisation dus à des encéphalites virales. Le VHS-1 est jusqu'à présent la cause principale d'encéphalite virale sporadique mortelle aux États-Unis avec un taux national annualisé d'environ 1250 cas. De plus, l'utilisation des nouvelles méthodes de détection ayant une haute sensibilité, a permis de montrer que le nombre de cas est 4 fois plus élevé que le nombre enregistré au vingtième siècle (1 cas/100 000 individus). Les virus isolés des muqueuses et du liquide céphalorachidien (LCR) des patients ont montré qu'un tiers des cas survient lors d'une primo-infection alors que les deux tiers sont causés par une infection secondaire ou récurrente (99-102).

L'EH est une maladie rare avec un faible pronostic. La mortalité, qui atteint environ 70% sans traitement, est de 20 à 30% si le traitement antiviral (acyclovir (ACV)) est administré dès les premières heures de l'apparition de la maladie. Malgré la survie améliorée, les séquelles neurologiques sont présentes dans 70% des survivants de cette maladie très

coûteuse pour le système de santé et de soin. Il existe une certaine corrélation de l'incidence en fonction de l'âge : une faible et forte augmentation à partir de 3 et de 50 ans, respectivement. L'âge moyen des patients est de 53 ans et plus de mortalité est observée chez les patients de plus de 50 ans. Il a été rapporté que le ratio d'incidence pour les deux sexes est de 1:1, mais il existe également des données suggérant une prédominance chez les hommes (102-104).

6. Les manifestations cliniques des maladies liées aux infections herpétiques

Le temps d'incubation des VHS varie de 1 à 26 jours avec une médiane de 4 jours. Durant l'infection primaire au VHS-1, une très grande variété de symptômes est observée : fièvre, maux de tête, œdème, anorexie, lésions ulcératives et adénopathies. Les lèvres, la langue, la gencive, le palais et toute la muqueuse buccale sont les endroits où les lésions apparaissent. Le processus de cicatrisation prend environ une semaine. Ces manifestations cliniques sont majoritairement associées à l'infection primaire au VHS-1. Toutefois le VHS-2 peut également en être la cause. Ainsi, il est suggéré qu'une personne séropositive pour le VHS-2 est partiellement protégée et moins susceptible à développer des symptômes, si infecté par le VHS-1 (105, 106). Des complications plus sévères liées à l'infection herpétique orolabiale comme l'obstruction des voies respiratoires supérieures ou des infections secondaires bactériennes qui nécessitent une hospitalisation surviennent rarement. Pour ces cas sévères, la guérison prend de 2 à 3 semaines (107).

Des infections récurrentes au VHS-1 sont plus fréquentes que celles au VHS-2 et peuvent apparaître sous différentes formes. 20-40% des infectés développent, au moins une à deux fois par an, des lésions cutanées autour de la bouche que l'on appelle herpes labialis (boutons de fièvre/feux sauvages). Ces lésions cutanées peuvent aussi apparaître autour du menton et du nez (108). La présence de plusieurs petites vésicules érythémateuses remplies de fluide est un trait caractéristique de l'herpès labial. Ces vésicules se rupturent dans les deux jours suivants leur apparition. Par la suite, la lésion devient ulcératrice et perdure pour environ 5 jours. La guérison complète prend 10 jours (88). Plusieurs autres manifestations cutanées existent, comme l'herpès gladiatorum chez les sportifs pratiquant des contacts

physiques et l'eczéma herpeticum dans des endroits avec des dermatoses préexistantes souvent chez les enfants (109).

Les infections génitales sont causées majoritairement par le VHS-2. Les lésions apparaissent au niveau du pénis ou des lèvres vaginales et leur guérison survient environ 20 jours suivant leur apparition dans une primo-infection. Les principaux symptômes au niveau local chez les femmes sont des lésions ulcératives accompagnées par des maux et des démangeaisons. La méningite aseptique et les lésions extragénitales sont les complications les plus sévères de cette infection. La majorité des patients ont des charges virales élevées dans le col d'utérus et l'urètre après la primo-infection. Les symptômes sont souvent plus sévères chez les femmes que chez les hommes. Chez les hommes, on trouve souvent des charges virales plus faibles que celles retrouvées chez les femmes. L'urètre est également la partie la plus touchée des organes génitaux masculins. La sécrétion virale dure environ 3 semaines. Dans le cas des infections récurrentes au VHS-2, les symptômes sont très modérés, voire inexistantes, ce qui pose plus de problèmes à cause de la possibilité de transmission imprévisible du virus aux partenaires et aux nouveau-nés. Le VHS-1 est aussi le responsable d'un pourcentage significatif (environ 40%) des infections génitales. Les symptômes liés à l'infection génitale par le VHS-1 sont beaucoup moins sévères et moins récurrents que ceux dus au VHS-2 (110-112).

Une des plus grandes complications des infections génitales est la transmission facilitée du virus aux nouveau-nés. Le VHS-2 est responsable de 60 à 70% des cas des infections néonatales. En effet, 40% des transmissions ont lieu durant la primo-infection des femmes enceintes. Cependant, le taux de transmission aux nouveau-nés chez les femmes enceintes développant des infections récurrentes diminue à 3% (95, 113). Il est intéressant de noter que la préexistence d'anticorps contre le VHS-1 ne diminue pas le risque de transmission de la mère au nouveau-né. En fonction de la voie de transmission, les infections chez les nouveau-nés sont classifiées en deux types : une infection congénitale très rare qui se déroule pendant la grossesse et une infection périnatale, qui réfère à une contamination du bébé par le virus durant l'accouchement. 10 à 30 % des bébés infectés au niveau de la peau, des yeux ou de la bouche développent des problèmes neurologiques. Ces atteintes peuvent se manifester de façon agressive chez les nouveau-nés, mais les complications sont plus

sévères encore dans le cas d'une infection congénitale que périnatale. Les fausses couches sont fréquemment observées pendant les infections génitales survenant dans la phase précoce de la grossesse. Cependant, les problèmes reliés au retard de croissance et les accouchements prématurés sont plutôt reliés à une infection durant la phase tardive de la grossesse (114, 115).

L'infection oculaire aux VHS est la cause majeure de la cécité dans des pays développés. Une primo-infection oculaire par ces virus est possible *via* le contact de l'œil des nouveau-nés avec les lésions génitales causées majoritairement par le VHS-1 malgré la prédominance du VHS-2 dans ces dernières. Elle se manifeste sous forme de conjonctivite ou kératite. Pourtant, la majorité des infections oculaires sont associées à une réactivation du VHS-1 latent et se présentent de façon unilatérale. Le virus réactivé remonte jusqu'à la cornée en utilisant les NT. La blépharoconjonctivite, l'ulcère de la cornée et les kératites stromales sont les manifestations les plus communes de l'infection oculaire herpétique. Les symptômes sont souvent modérés, tels que la photophobie, des larmoiements ou des ulcères de la cornée. La kératite, qui est la forme la plus dangereuse de ce type d'infection, peut mener à une perte de la vision pouvant nécessiter une greffe de la cornée ((116-118).

Il est observé que la co-infection d'une personne avec le virus de l'immunodéficience humaine (VIH) augmente la récurrence et la sévérité des symptômes cliniques des infections aux VHS, ce qui démontre l'importance d'un contrôle immunitaire de type cellulaire. Les personnes atteintes d'une infection génitale au VHS, ayant des lésions génitales favorisant l'infection au VIH, ont 2 à 3 fois plus de risque de contracter ce dernier. De plus, la séroprévalence des infections aux VHS est plus élevée chez les personnes VIH⁺ (environ 90-100% pour le VHS-1 et à 52-95% pour le VHS-2) comparée à la population générale. Chez les immunosupprimés, les maladies disséminées au niveau des muqueuses, du derme et des viscères dues à une infection à VHS sont fréquentes. La guérison de ce type d'atteinte peut durer environ 6 semaines, ce qui augmente également le risque d'émergence de souches résistantes aux traitements antiviraux, comme l'ACV. Même les voies respiratoires, l'œsophage et le tractus intestinal peuvent être visés par ces virus herpès simplex réactivés. Chez les patients à traiter par des immunosuppresseurs pour une transplantation d'organe, il

faut vérifier le taux d'anticorps dirigés contre le VHS pour donner une prophylaxie (119-121).

6.1. Le diagnostic des maladies liées aux infections aux VHS

Les infections aux VHS donnent souvent des symptômes cutanés, sous forme d'ulcérations multiples, rondes et superficielles qui orientent le diagnostic. En plus des observations cliniques, le diagnostic est fait par des analyses microscopiques, des tests sérologiques, de la culture virale ou bien par la PCR (pour « *Polymerase Chain Reaction* ») sur des prélèvements tels que l'urine, les selles, les écouvillons cutanés, le LCR, les biopsies et plusieurs autres tissus (98, 122).

Des biopsies colorées selon différentes méthodes peuvent être examinées par la microscopie. La détection des inclusions intranucléaires composées d'acide nucléique et de protéines ou bien de cellules multinucléaires géantes indique une infection par l'un des VHS ou d'autres virus herpétiques. Cependant cette méthode ne permet pas de faire un diagnostic complet à cause d'un manque de spécificité (123).

Les techniques d'ELISA (pour « *Enzyme-linked immunosorbent assay* ») et du WB (pour « *Western Blot* ») sont majoritairement utilisées pour les tests sérologiques, détectant les deux types anticorps : IgM et IgG ciblant les VHS, produits dans la phase précoce et tardive de l'infection, respectivement. La confirmation d'une infection antérieure peut aider le médecin dans le choix d'administration de traitements prophylactiques contre le virus chez certains groupes de patients immunosupprimés, mais également chez les femmes enceintes en cas de suspicion d'herpès génital asymptomatique afin de réduire le risque de transmission de l'un des VHS à l'enfant (124, 125).

La confirmation d'une infection aux VHS nécessite la détection virale, qui peut s'effectuer à l'aide des techniques comme ELISA et WB permettant la détection des protéines virales dans les différents types d'échantillons ou bien par l'étude de l'effet cytopathique observé à la suite de la réplication des VHS. Les lignées de cellules majoritairement utilisées pour les cultures du VHS sont : les fibroblastes (MRC-5), les cellules d'adénocarcinome pulmonaire humain (A549) et les cellules épithéliales de rein extraites d'un singe vert africain (Vero). Puisque le diagnostic ne peut pas se faire qu'en fonction des effets cytopathiques, des anticorps monoclonaux spécifiques à chaque type de VHS sont utilisés afin de confirmer le

pathogène responsable de ces effets observés en culture. Cette méthode permet d'isoler le virus qui est la preuve définitive d'une infection et rend également possible l'évaluation de la sensibilité de ce dernier aux différents antiviraux (126, 127).

La méthode de référence actuelle de diagnostic des infections aux VHS est la PCR. Grâce à sa sensibilité (>95%), sa spécificité (98%) et sa rapidité, la PCR a révolutionné le diagnostic des infections aux VHS. La technique est basée sur la détection des différents gènes du VHS-1 ou 2 (par exemple, ADN pol et/ou gB), par des amorces spécifiques, dans des prélèvements de patients. De plus, contrairement à la culture virale qui nécessite des virions infectieux, le matériel génétique du virus est suffisant pour la détection du virus (128-130).

7. Les manifestations cliniques de l'EH

L'EH est une encéphalite virale aiguë causée par des infections, souvent récurrentes, aux VHS. La majorité des patients souffrant de l'EH ont des déficits immunologiques (104). À l'heure actuelle, le modèle de la propagation *via* les NT durant la phase de réactivation est acceptée en tant que le moyen d'invasion du SNC par ce virus. Cependant les voies de propagation ne sont toujours pas claires. Les noyaux sensoriels de ces NT se trouvent dans le tronc cérébral, ce qui est censé favoriser l'apparition des lésions dans cette région du cerveau. Contrairement à ce qui est attendu, les lésions sont majoritairement retrouvées dans d'autres parties du cerveau que le tronc, qui montre que le modèle de la propagation *via* les NT reste à clarifier. En plus des NT, il y a une deuxième porte d'entrée potentielle au cerveau, qui peut servir aux virus pour accéder au SNC : les voies neuronales olfactives. L'isolation de deux différentes souches à partir d'une lésion orolabiale et du liquide céphalorachidien au sein de la même personne nous a permis d'accepter que l'EH peut être induite par une primo-infection. Cette différence entre les souches est retrouvée dans 35% des patients. Dans le cas de primo-infection, ces nerfs olfactifs sont suggérés comme la principale voie d'invasion du SNC. Les lésions se concentrent dans le système limbique et les régions temporales du cerveau. Ainsi, le virus est détecté dans les lobes frontaux, temporaux et rarement au niveau du tronc cérébral. Les deux hémisphères du cerveau peuvent simultanément être touchés au

cours de l'EH, potentiellement à l'aide du passage du virus *via* la commissure antérieure (131-133) (Figure-7).

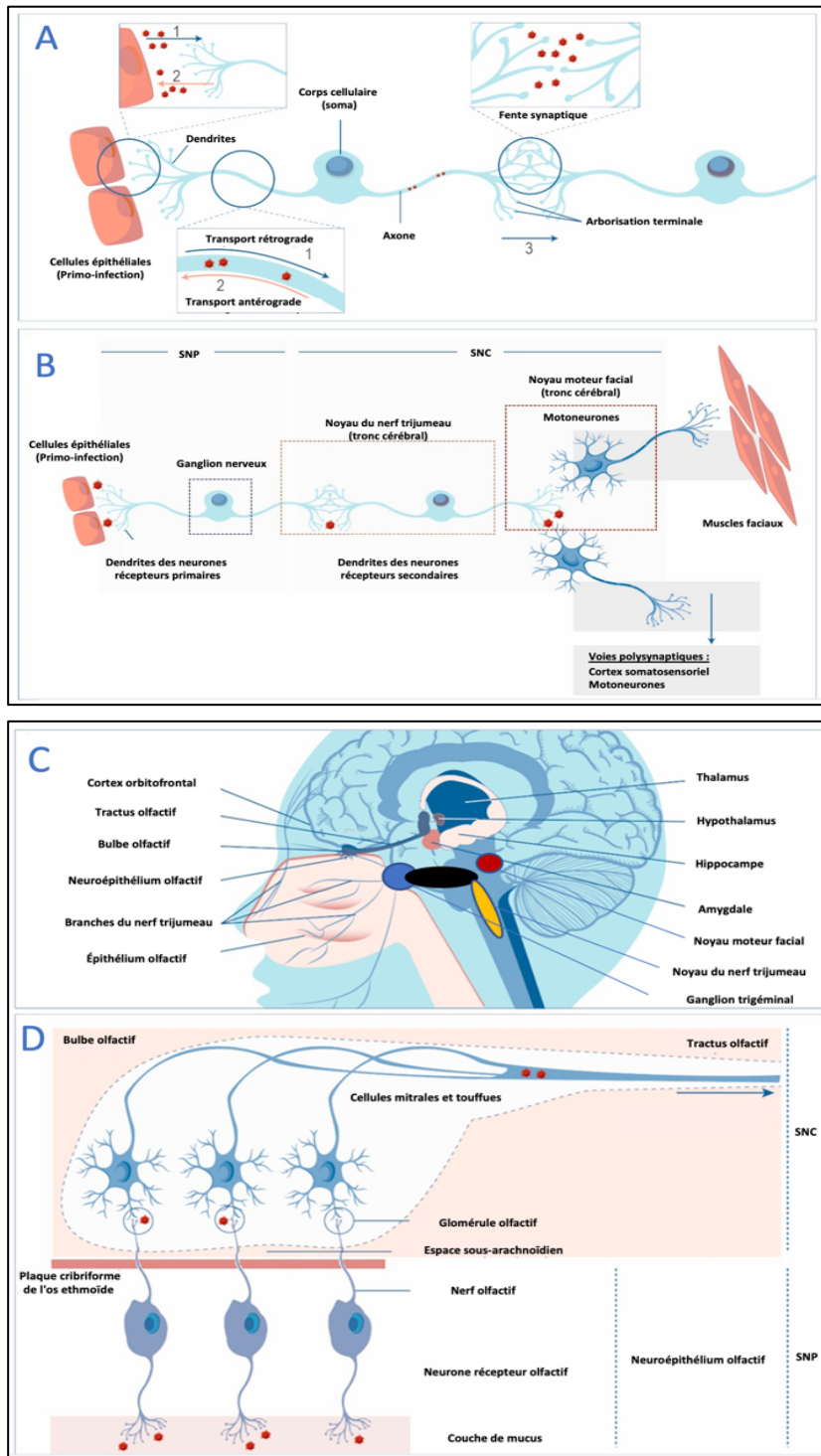


Figure-7 : Propagation du VHS-1 au SNC *via* le NT et olfactif

Adapté de (134) : (A) Le VHS-1 passe de l'épithélium au SNP par la propagation de cellule à cellule entre les cellules épithéliales et les terminaisons des neurones sensoriels qui les innervent « 1 ». Le virus se déplace par le transport rétrograde jusqu'au corps cellulaire du neurone sensoriel, situé dans le GT. Le VHS-1 remonte par le transport antérograde jusqu'aux cellules épithéliales où la primo-infection a eu lieu « 2 ». Le virus se propage de manière transsynaptique, traversant la fente synaptique « 3 ». (B) Après l'infection des cellules épithéliales, le VHS-1 se propage au SNP ; il rentre en contact avec les terminaisons nerveuses et infecte les neurones sensoriels. Ensuite, le virus migre via le transport rétrograde jusqu'au corps cellulaire où il établit la latence. Par la suite, le virus se propage de manière transsynaptique au tronc cérébral, qui donne l'accès aux zones supérieures du cerveau. (C) La propagation au SNC peut se faire par les trois branches du NT. De là, le virus accède au noyau trijumeau et à d'autres structures cérébrales représentées sur le schéma. Le VHS-1 peut également pénétrer le SNC via le neuro-épithélium olfactif et peut atteindre le bulbe olfactif puis se propager à travers le tractus olfactif pour atteindre les structures limbiques, telles que l'hippocampe, l'amygdale ou le cortex orbitofrontal. (D) Le VHS-1 atteint le bulbe olfactif en infectant les neurones sensoriels olfactifs, dont les axones traversant l'os ethmoïde à travers la plaque criblée. Ces neurones forment des synapses avec des cellules mitrales et touffues dans les glomérules. Le virus peut infecter ces cellules de manière transsynaptique au niveau des glomérules et se propager au SNC via le tractus olfactif.

Chez l'Homme, des lésions sont nécrotiques et accompagnées d'œdème et d'une inflammation périvasculaire. Les signes caractéristiques de la maladie causée par cette infection du SNC sont l'altération de l'état de conscience, la fièvre ($> 38,5^{\circ}\text{C}$), des céphalées et des convulsions. Une pléocytose dans le LCR est fréquente. Au début de la maladie, les patients présentent des troubles cognitifs qui sont accompagnés par des comportements anormaux, indiquant une atteinte neurologique. Les manifestations, telles que la fièvre et les céphalées, qui sont des symptômes généraux des infections du tractus respiratoire et systémique, peuvent mener à une confusion et un retard de diagnostic. La vitesse de la prise en charge du patient est cruciale. Des séquelles neurologiques sont fréquemment présentes chez les survivants ayant déjà développé des symptômes, tels que les désordres

neurologiques, l'aphasie, l'ataxie, l'amnésie, les convulsions ou bien des crises d'épilepsie, au cours de l'infection. Chez les patients immunosupprimés, des lésions post-ischémiques et non inflammatoires sont très rarement observées (132, 135).

7.1. Le diagnostic de l'EH

Les patients atteints de l'EH développent certains symptômes communs qui facilitent le diagnostic. Il a été constaté que 90% des patients d'EH avait déjà développé des anomalies de conscience au moment de l'admission à l'hôpital. Une leucocytose, une neutrophilie et une hyponatrémie ont été ainsi rapportées chez ces patients. De plus, l'analyse de leurs LCRs a montré une pléiocytose lymphocytaire, accompagnée d'une concentration protéique élevée (136). L'ensemble de ces données obtenues d'un patient indique la possibilité d'une EH. En revanche, il ne faut pas oublier qu'aucune de ces observations n'est spécifique à l'EH et la plupart de ces symptômes peuvent être provoqués par d'autres maladies avec des atteintes cérébrales.

Toutes les méthodes décrites précédemment pour la détection des infections aux VHS restent valides aussi pour le diagnostic d'HSE. Avant les avancées biotechnologiques, le diagnostic de l'EH était basé sur la culture des VHS isolés d'une biopsie cérébrale. Cette grande complication du diagnostic de l'EH a été remplacée grâce à la PCR sur le LCR ; méthode moins invasive et plus rapide. Actuellement, la détection de l'ADN viral dans le LCR par la PCR est considérée comme la méthode de choix (132, 137) (**Figure-8**).

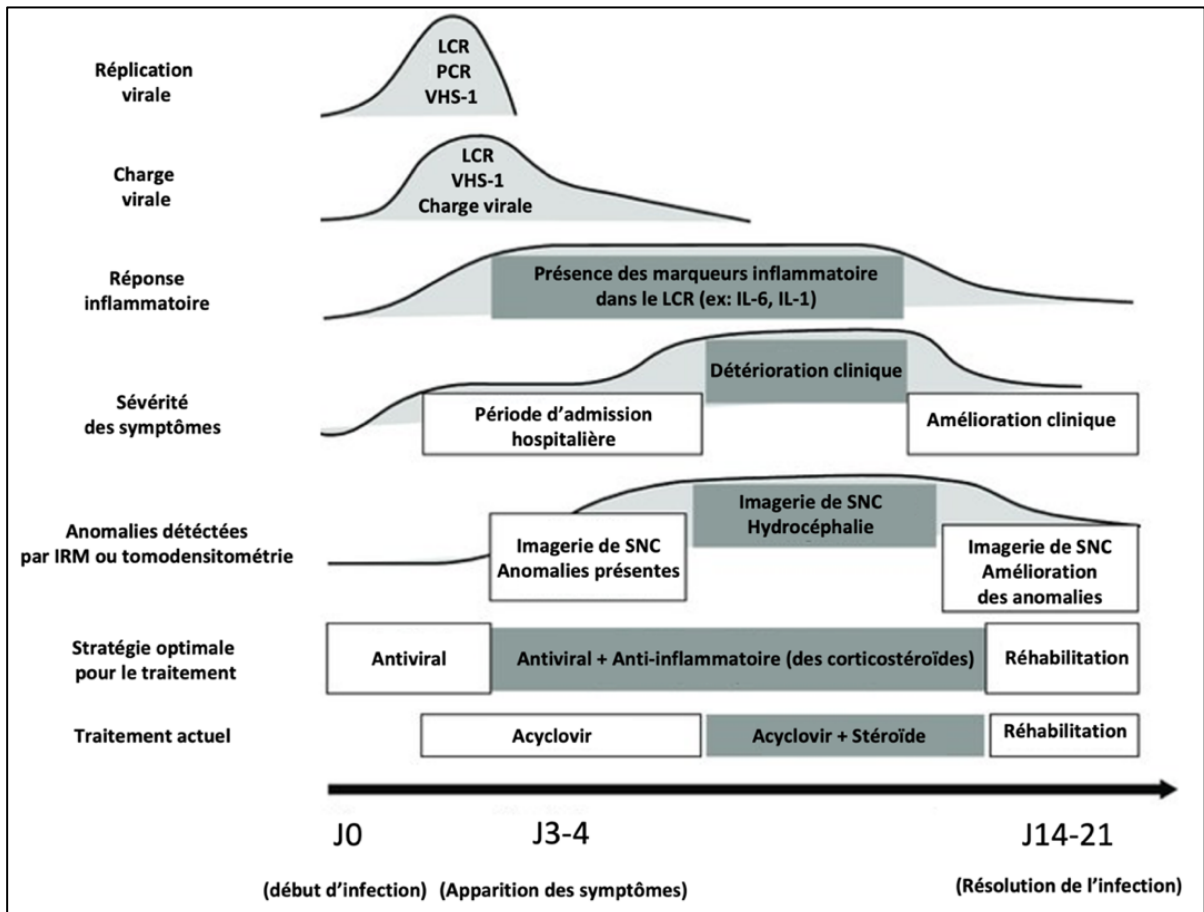


Figure-8 : Les corrélats cliniques, physiopathologiques et radiologiques au cours de l'EH

Adapté de (138) : La réplication du VHS-1 commence avant l'admission hospitalière de patient symptomatique. La stratégie optimale de traitement nécessite une administration immédiate des antiviraux, avant la confirmation de l'EH par PCR sur le LCR. L'évaluation de l'infection durant le traitement antiviral combiné ou non aux stéroïdes, peut s'effectuer par l'imagerie de SNC, qui offre une méthode non-invasive de suivi de l'EH.

Il existe deux méthodes qui sont encore moins invasives, soient l'imagerie par résonance magnétique (IRM) et l'électroencéphalogramme (EEG). L'IRM, avec ou sans administration d'un agent de contraste, est le meilleur choix de neuro-imagerie pour évaluer l'HSE. Des foyers hyper intenses en T2 signalant un important œdème au niveau des lobes temporaux et frontaux sont fréquemment observés par IRM chez ces patients. Il est même

spéculé que l'IRM de diffusion, basé sur l'observation de la diffusion des molécules d'eau, pourrait être plus sensible que la PCR dans la phase précoce de la maladie (139). L'EEG mesurant l'activité électrique aide au diagnostic, mais aussi au pronostic. L'EH est identifiable par sa signature électrique typique composée de décharges périodiques, de ralentissement focalisé et d'électrographies ressemblant à celle d'une crise d'épilepsie (132, 140). Malgré l'existence de ces méthodes non invasives de diagnostic, un certain nombre de cas complexes ayant des manifestations cliniques inhabituelles peut quand même nécessiter une biopsie (141).

8. Les traitements antiviraux

De nos jours, il existe trois catégories de molécules approuvées, qui sont les analogues acycliques guanosidiques (ACV, Ganciclovir, Penciclovir (PCV), Valacyclovir (VACV), Valganciclovir, Fanciclovir (FCV)), nucléotidiques (Cidofovir (CDV), Adefovir dipivoxil) et les analogues des pyrophosphates (Foscarnet (FOS)). Ces trois classes de molécules ont été développées afin d'inhiber la réplication de l'ADN viral. Plusieurs autres molécules, telles que des immunomodulateurs (par exemple, des interleukines (IL) et des interférons (IFN)), des protéines antimicrobiennes et des anticorps spécifiques) continuent à être développées et testées contre les infections aux VHS. Cependant, aucune n'a pu remplacer les analogues nucléosidiques ayant toujours une meilleure efficacité (142). Les analogues nucléosidiques ont d'abord besoin d'être phosphorylés par la TK virale suivie des kinases cellulaires afin d'être transformés en leur forme active. L'ACV ayant une affinité 200 fois plus pour la TK virale que celle de la cellule hôte permet une activation de la molécule anti-VHS uniquement chez les cellules infectées, qui fait de l'ACV un traitement spécifique et plus sécuritaire avec moins de toxicité. Contrairement à cette dernière famille de molécules, les analogues de nucléotides sont uniquement phosphorylés par des kinases cellulaires avant de devenir actifs. Le FOS n'a besoin ni de machinerie cellulaire ou virale pour inhiber l'activité de l'ADN polymérase virale (108, 143) (**Figure-9**).

Le choix de traitement se base sur des critères incluant la nature de l'infection, le site d'infection et l'état immunitaire des patients. L'ACV et sa prodrogue VACV, représentent le traitement anti-VHS de référence. Les infections labiales ou génitales sont souvent traitées

par l'application de l'ACV ou de PCV directement sur la lésion sous forme de crème. L'ACV, VACV ou FCV administrés par voie orale restent toujours à considérer, afin d'avoir une meilleure efficacité et un résultat rapide (92).

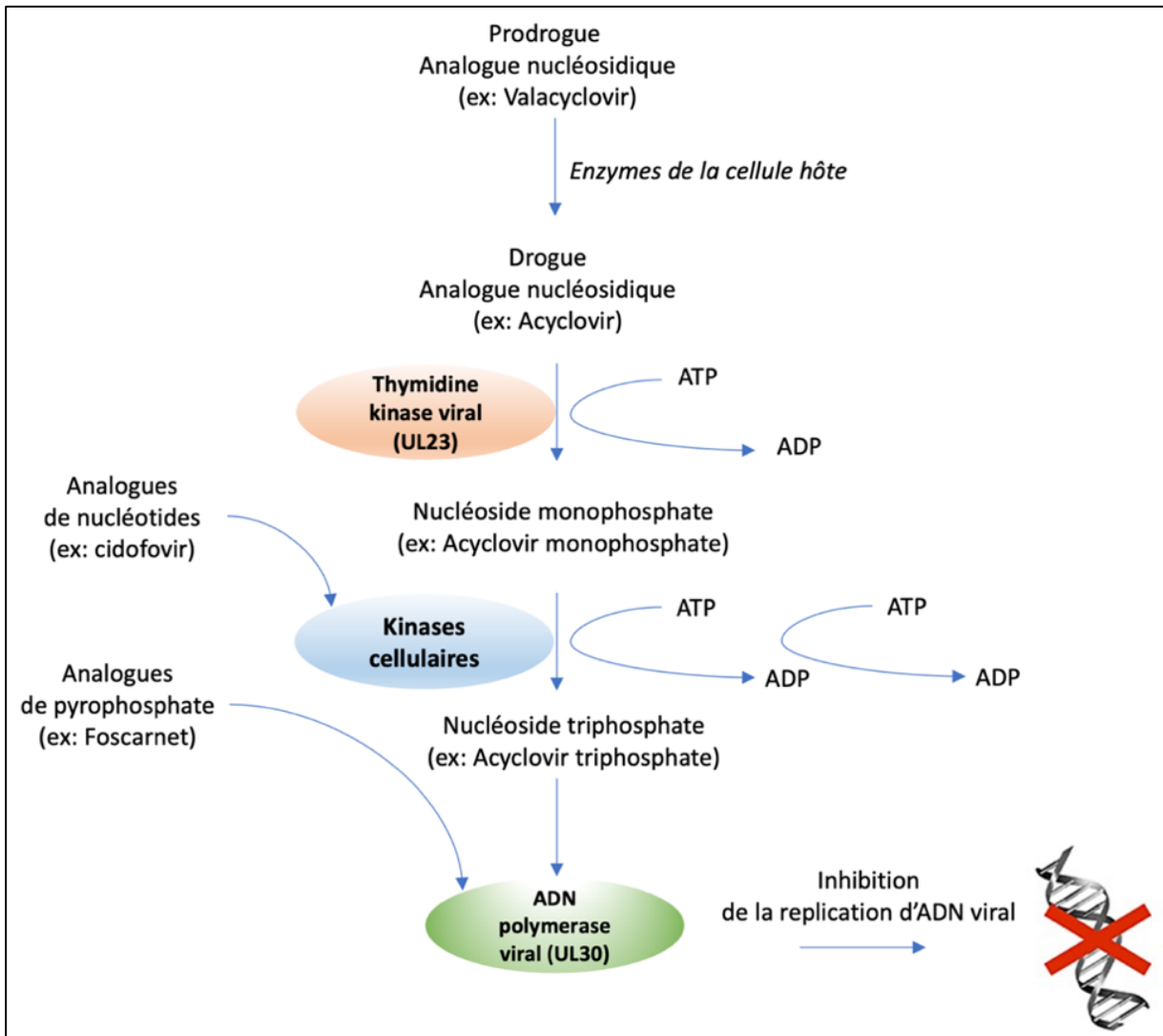


Figure-9 : Mécanisme d'action des analogues d'acide nucléique anti-herpétique

Adapté de (144) : L'émergence de souches résistantes aux traitements antiviraux peut se développer particulièrement chez les individus immunosupprimés. Les mutations conférant la résistance apparaissent principalement sur le gène de la TK (UL23) dans 95 % des cas, et sur le gène de l'ADN polymérase virale (UL30) dans 5% des cas. La résistance

aux FOS ou CDV apparait seulement par une substitution d'acides aminés dans l'ADN polymérase (60, 145, 146).

8.1. Le traitement de l'EH

8.1.1. Les traitements antiviraux

L'EH nécessite un début de traitement rapide pour un meilleur pronostic. L'administration de l'ACV par voie intraveineuse (30 mg/kg/jour) pendant 14 à 21 jours est le traitement de premier choix contre l'EH (132). L'administration intraveineuse de l'ACV ayant un niveau de passage faible à travers la BHE, permet d'atteindre une concentration sanguine élevée qui permet ainsi d'avoir une concentration d'ACV plus élevée dans le prachyme cérébrale. Il a été précédemment montré que lors d'une administration orale, la concentration d'acyclovir dans le LCR représente que 13 à 52 % de celle retrouvée dans le plasma. L'ACV passe par le foie et donne lieu à la 9-carboxyméthoxyméthylguanine, qui est le métabolite majoritaire généré par l'oxydation de l'ACV par l'alcool déshydrogénase 1A et par l'aldéhyde déshydrogénase 2. Les transporteurs d'absorption des familles de transporteurs d'anions organiques et de transporteurs de cations organiques sont nécessaires pour l'élimination rénale de l'ACV non-métabolisé (147, 148).

Le choix de durée et de dose du traitement administré peut jouer un rôle crucial sur l'apparition des rechutes (5-27% des patients atteints d'une EH). Chez les nouveau-nés atteints d'une EH, il a été montré que l'administration d'une double dose prolongée a significativement diminué le risque des rechutes suivant l'arrêt du traitement (114). Cependant, une augmentation de dose de 30 à 45 mg/kg/jour n'a pas eu d'effet ni sur le pronostic ni sur le nombre de rechutes (149). Pour éviter les rechutes, un traitement prolongé d'ACV ou de VACV par voie orale est recommandé, une fois sorti de l'hôpital (150). Malgré son activité antivirale spécifique et sa toxicité assez réduite, une concentration élevée d'ACV administrée pour une longue période peut avoir des impacts négatifs sur les fonctions rénales et hépatiques. De plus, cela peut contribuer à l'apparition de mutations conférant la résistance. Une absence d'amélioration des signes cliniques sous traitement, spécifiquement chez les immunosupprimés, doit signaler la possibilité de l'apparition de résistance contre l'ACV. Dans ce cas-là, le traitement suggéré serait le FOS par voie intraveineuse (132).

8.1.2. Les traitements immunomodulateurs

Certains patients développent une encéphalite auto-immune induite par l'EH, qui est caractérisée par l'absence des lésions nécrotiques et par la présence des IgG anti-récepteur de l'acide N-méthyl-D-aspartique (NMDA) ou anti-récepteur de dopamine D2 dans le sérum ou le LCR (151). Il a été suggéré que la lyse neuronale par le virus déclenche une réponse immunitaire contre cette protéine de surface se trouvant sur certains sous-types neuronaux. Le mécanisme exact reste toujours inconnu. Cette complication est traitée par des stéroïdes ou bien par des Ig contre le VHS-1, afin d'inhiber une potentielle reinfection (152).

La réponse immunitaire dans la phase précoce de la maladie est acceptée comme l'élément majeur nécessaire pour l'inhibition de la réplication du VHS-1. En accord avec ce dernier, on voit qu'en cas d'immunosuppression, comme chez les patients traités par les anticorps monoclonaux anti-TNF- α , l'incidence d'EH augmente (153). Toutefois, la réponse inflammatoire exacerbée, retrouvée dans la phase tardive de la maladie, est néfaste et nécessite l'utilisation des immunomodulateurs afin de contrôler l'inflammation (154). Un meilleur pronostic observé chez les patientes atteintes d'EH sous un traitement de corticostéroïdes, tels que la prednisolone, la méthylprednisolone ou la dexaméthasone, en même temps que l'ACV, a montré que l'immunomodulation pourrait être intégrée dans la stratégie du traitement de l'EH (155-157).

Les corticostéroïdes inhibent l'activité des facteurs de transcription comme le NF- κ B (pour « *Nuclear factor-kappa B* ») et l'AP-1 (pour « *Activator protein 1* ») et diminuent l'expression des gènes pro-inflammatoires. Les études ont suggéré que l'administration de dexaméthasone ou prednisolone diminue la production d'IL-6 et diminue les séquelles neurologiques, majoritairement dues à la mort neuronale induite par l'inflammation (158). En parallèle, les modèles murins atteints d'EH traités par les immunomodulateurs combinés aux antiviraux ont confirmé que l'immunomodulateur complémentaire permet de diminuer l'inflammation, sans impacter la réplication virale. De plus, il a été suggéré que l'administration des corticostéroïdes doit se faire suite à l'apparition des symptômes et pas avant, afin d'avoir un effet bénéfique (132, 159, 160).

9. Les vaccins

La majorité de la population mondiale est infectée par au moins un des trois Alphaherpesvirinae humains, que sont le VHS-1, VHS-2 et VVZ (161-163). Au cours des dernières décennies, plusieurs tentatives ont été faites afin de développer des vaccins pour prévenir ces infections ou réduire le risque de développer les formes graves qui présentent un gros fardeau sanitaire et économique. Ces efforts ont porté fruit pour le VVZ, contre lequel il existe plusieurs options de vaccin. Cependant, il n'existe toujours aucun vaccin efficace contre les VHSs (164).

Le premier vaccin contre la varicelle, causé par le VVZ, est un vaccin vivant atténué. Le VVZ, isolé initialement d'un enfant, a subi plusieurs passages en culture cellulaire qui ont permis l'acquisition de mutations inhibant sa virulence, avant de l'injecter chez l'Homme (165). En 2006, l'Agence américaine des produits alimentaires et médicamenteux (FDA) a approuvé l'utilisation de Zostavax (Merck and Co), qui correspond à une dose élevée de VVZ vivant atténué, chez les personnes âgées de 50 ans ou plus. Récemment, l'administration de deux doses d'un autre vaccin approuvé en 2017, Shingrix (GlaxoSmithKline) qui consiste en la gE du VVZ combinée aux adjuvants stimulant la réponse LT CD4⁺, a montré une meilleure efficacité que Zostavax chez les personnes âgées de 50 ans ou plus (164, 166, 167).

Les propriétés antigéniques similaires du VHS-1 et VHS-2 permettent aux vaccins d'herpès simplex d'induire la réactivité croisée aux deux VHS à l'aide d'un seul vaccin. Deux différents vaccins sous-unitaires, gB/gD/MF59 (Chiron) et gD/AS04 (GSK) qui ne contiennent que les parties antigéniques des glycoprotéines du VHS-1, ont atteint la phase III des études cliniques, mais n'ont pas eu un effet suffisamment protecteur pour être commercialisés (168, 169). Divers mécanismes d'échappement immunitaire du VHS-1 et 2 compliquent le développement du vaccin. Par exemple, ils sont capables de manipuler la machinerie à l'aide des protéines virales comme l'ICP0 ou l'ICP34.5. Ce dernier peut aussi s'attacher au TAP (pour « *Human transporter associated with antigen presentation* ») et perturber la présentation d'antigène *via* le CMH-I (170). Il a été montré que les VHS infectent les cellules voisines, sans forcément avoir besoin de se retrouver en dehors de la cellule, où les anticorps sont censés neutraliser les virus. Tel que mentionné précédemment, la formation des cellules géantes multinucléées est le résultat de VHS-1 favorisant une fusion des

membranes des cellules voisines avec celles des cellules infectées, lui permettant d'induire une transmission de cellule à cellule. De plus, les glycoprotéines E et I exprimées sur les cellules infectées, capables d'agir comme un analogue des récepteurs de Fc (pour « *fragment cristallisable* ») (FcR), peuvent se lier à la partie Fc des anticorps et empêcher la neutralisation des virus (171-174).

Les nouvelles technologies permettent de développer des vaccins plus efficaces. Récemment, un vaccin ARNm composé des séquences codantes de gC, gD et gE encapsulées dans des liposomes a démontré une efficacité supérieure à celui d'un autre vaccin trivalent composé de gC, gD et gE. Ce vaccin en phase préclinique induit des quantités importantes d'IgG neutralisantes, accompagnées d'une réponse LT CD4⁺ (164, 175).

10. L'édition génomique du VHS-1 et l'utilisation des VHS-1 recombinants

Au cours des dernières décennies, les scientifiques ont développé des méthodes de manipulation du génome de VHS, qui ont permis d'étudier précisément la fonction des gènes viraux, de comprendre la pathogenèse de ces infections, dont l'EH. À l'heure actuelle, il existe cinq méthodes permettant la modification génomique des VHS (176, 177).

La première méthode la plus ancienne est la génération des mutants sensibles à la température. Cette méthode consiste en deux étapes majeures qui sont le traitement des cellules infectées par des mutagènes ou par les rayons UV à une température permissive et la sélection des mutants qui ne sont pas capables d'induire un effet cytopathique à une température non permissive. Il est considéré que ces mutants, incapables de pousser à une température non permissive, sont des virus qui ont acquis des mutations suite au traitement chimique qui les rendent sensibles à une température élevée inhabituelle (178). Plusieurs mutants de VHS-1 thermosensibles ont été utilisés dans le cadre des études d'EH. Une étude de 1983 a montré que l'infection intrapéritonéale par un mutant de VHS-1 incapable de se répliquer *in vivo*, entraîne une résistance à l'infection intracrânienne directe par une autre souche de VHS-1, capable de se répliquer. Cette observation a permis de souligner l'impact potentiel d'un vaccin inactivé contre l'EH (179). Cette méthode permet de générer plusieurs mutants. Cependant, l'occurrence aléatoire de plusieurs mutations sur plusieurs gènes complique les études d'association d'un phénotype à un génotype.

La deuxième méthode est la mutagenèse dirigée assistée par marqueurs. Le procédé commence par la construction d'un plasmide dans lequel la séquence du marqueur est insérée dans la séquence cible. Ensuite, l'ADN viral et le plasmide sont co-transfectés pour insérer la séquence du marqueur dans la séquence à modifier, à l'aide de la recombinaison homologue. À la suite de la sélection des virions recombinants, une autre étape de co-transfection de nouvel ADN viral avec l'insert et un deuxième nouveau plasmide contenant la modification désirée (une déplétion, une insertion ou bien une mutation ponctuelle), est effectuée. Enfin, une sélection négative des virions sans marqueur permet de récupérer seulement les virus recombinants ayant inséré la nouvelle séquence modifiée qui ne contient pas de marqueur (176, 180, 181). À la suite de la détection de la mutation G375T chez le VHS-1 isolé d'un cas d'EH néonatal résistant à l'ACV, la mutagenèse dirigée assistée a permis de générer le mutant G375T. Ce dernier a été utilisé pour démontrer que la mutation G375T confère la résistance à l'ACV (182). Plusieurs étapes d'isolation et de passages nécessaires pour cette méthode peuvent favoriser des mutations aléatoires. Il faut surveiller que l'insert affecte le phénotype du virus le moins possible (176).

L'utilisation des clones de cosmides est la troisième méthode permettant de générer des VHS-1 mutants. Un cosmide correspond à un plasmide artificiel contenant une Ori, un marqueur de sélection, plusieurs sites de clonage et des extrémités cohésives, également connues sous le nom de sites cos (183). Cette méthode est basée sur la digestion du génome viral avec différentes enzymes de restriction et le clonage des fragments chevauchants générés dans des vecteurs cosmides. Après avoir modifié la région d'intérêt insérée dans le cosmide *in vitro*, une étape de traitement aux enzymes des restrictions permet de libérer tous ces fragments d'ADN viral incluant celui contenant la région modifiée. Enfin, tous ces fragments chevauchants sont transfectés chez la cellule où la production du virus recombinant aura lieu (176, 184). Le VHS-1 recombinant déplété du gène US3, généré à l'aide de cette méthode, a permis de montrer que la kinase codée par l'US3 est cruciale pour l'inhibition de l'apoptose de la cellule infectée (185). Le plus grand avantage de cette méthode est qu'il ne nécessite pas de purification sur plaque, car tous les virus reconstitués contiennent la modification du gène.

Une autre méthode fréquemment utilisée dans le domaine d'édition génique des virus est le chromosome bactérien artificiel (BAC). Ce vecteur bactérien, développé à partir du facteur de fertilité (le facteur-F), est capable de contenir des fragments d'ADNs jusqu'à 300 kpb, avec une grande stabilité génétique. La première étape pour générer les BAC du VHS-1 est de transférer des cellules avec l'ADN viral et le facteur-F contenant un marqueur de sélection (186, 187). L'insertion de ces fragments dans le génome viral se fait majoritairement à l'aide de la recombinaison homologe. À la suite de l'étape de sélection des virions contenant le BAC avec le marqueur, l'ADN viral épisomal est électroporée dans *E. coli*, pour pouvoir amener les modifications désirées dans le génome viral à l'aide des différentes techniques de la biologie moléculaire. Une de ces méthodes, la mutagenèse « *en passant* » chez la souche GS1783 d'*E. coli* avec le gène inductible de l'endonucléase I-SceI, permet d'éliminer le gène du marqueur, entouré des sites de restrictions d'I-SceI, qui se trouve sur le même fragment d'ADN avec les mutations désirées (176, 188). Cette stratégie a été utilisée pour générer le mutant déplété d'UL36 codant VP1-2, une protéine virale importante dans l'échappement du système immunitaire. L'utilisation de ce mutant dans un modèle d'EH a révélé que l'absence de l'activité de déubiquitineuse de VP1-2 conduit à l'augmentation de l'ubiquitination de STING (pour « *Stimulator of Interferon Genes* »), qui mène à l'augmentation de la production d'IFN- β et l'expression des ISGs (pour « *Interferon-stimulated genes* ») permettant d'inhiber la réplication virale dans les cerveaux de souris (189). Le BAC est un outil d'édition génique qui a accéléré la recherche sur le génome du VHS-1. Cependant, certains cas d'instabilité du génome ont été rapportés suite à l'observation des mutations non désirées sur les fragments d'ADN d'alphaherpesvirus (190).

La découverte du système CRISPR/Cas9 (pour « *Clustered regularly interspaced short palindromic repeats /CRISPR-associated protein 9* »), qui est un type d'immunité adaptative chez les archées et les bactéries, a révolutionné le domaine de l'édition génique. Ce système est formé d'une nucléase Cas9, de l'ARN CRISPR (ARNc) et d'ARNc transactivant. Au cours de l'adaptation de ce système en tant qu'outil, les deux ARNs ont été fusionnés et appelés l'ARN guide unique (ARNsg). Actuellement, les chercheurs ont juste besoin de désigner des fragments d'ARN de 20 pb ciblant la région de l'ADN à modifier et le cloner dans un plasmide contenant le gène codant pour Cas9. L'ensemble d'ARNsg et Cas9 patrouillent le génome et induisent une cassure de double brin trois nucléotides en

amont d'un motif adjacent de protospacer (PAM). Cette cassure est par la suite réparée par jonction d'extrémité non homologue (NHEJ) ou réparation dirigée par homologie (HDR) (176, 177). En pratique, les cellules permissives au VHS-1 sont co-transfectées avec un plasmide donneur, contenant le fragment portant les mutations désirées entre les bras d'homologie, et le plasmide de CRISPR/Cas9, afin d'insérer les mutations *via* HDR. Ces cellules transfectées sont ensuite infectées par le VHS-1. Après l'étape de sélection, de purification et de validation par le séquençage, le VHS-1 recombinant est prêt à utiliser (191). Toutefois, la nécessité de la séquence PAM et la possibilité d'induction de cassure double brins non spécifiques, appelée « *off-target* », sont certaines des limites de ce système (192). En plus de générer des mutants, le système CRISPR/Cas9 peut être utilisé pour inhiber la réplication du VHS-1 (**Figure-10**). Il a été rapporté que l'expression du CRISPR/Cas9, délivrée par les lentivirus injectés dans la cornée des souris atteintes de kératite herpétique, permet d'inhiber la réplication du VHS-1. De plus, la même étude a démontré que ces lentivirus se font transporter dans les NT *via* le transport rétrograde, et éliminent le réservoir du VHS-1 permettant d'éviter les kératites récurrentes (193, 194).

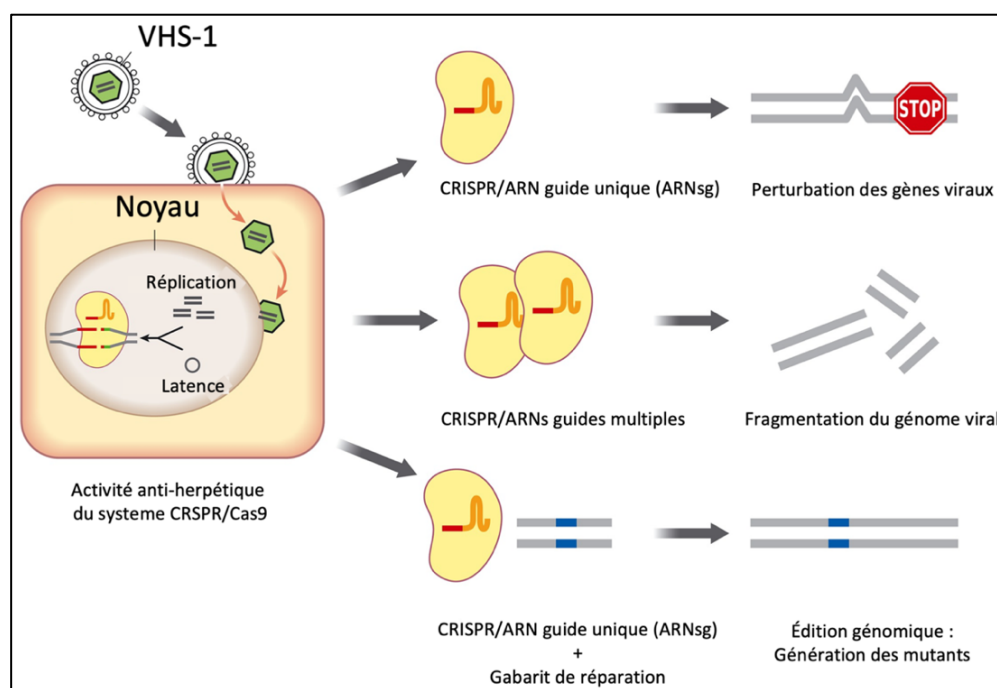


Figure-10 : L'édition génomique du VHS-1 à l'aide du système CRISPR/Cas9

Adapté de (195): Le VHS-1 délivre son génome au noyau. La présence d'ARNsg anti-VHS-1 et de Cas9 induit la formation de cassures d'ADN double brin, et active les voies de la réparation de la séquence d'ADN viral. Ce système peut être utilisé pour perturber les gènes viraux. Plusieurs sites viraux ciblés simultanément peuvent entraîner la fragmentation du génome, endommageant sévèrement le génome viral. Ce système peut être exploité également afin de générer des variants du VHS-1, en co-transfectant la cellule par un gabarit de réparation avec le plasmide de CRISPR/Cas9. Cette approche permet d'avoir une édition génomique exacte du VHS-1 à l'aide de l'HDR, qui permet d'intégrer le fragment d'ADN avec la modification désirée, qui se trouve insérée dans le gabarit de réparation.

Section-II : L'aspect neuroimmunologique de l'EH

1. Les barrières du SNC

L'ensemble du cerveau et la moelle épinière (ME) représentent le SNC. L'homéostasie ionique de ce compartiment, un facteur clé pour l'activité neuronale, est protégée par plusieurs structures anatomiques, aussi appelées « *barrières* ». Ces structures ayant des caractéristiques communes, permettant un passage contrôlé entre le SNC et le sang, sont regroupées sous le nom de la barrière hématoencéphalique (BHE) (196). Cette barrière, également appelée « *unité neurovasculaire* » (UNV), est formée de cellules endothéliales, de péricytes et de pieds astrocytaires. La connexion de tous ces composants de la BHE est assurée par une matrice extracellulaire protéique, composée de collagène IV, laminine, nidogen et de perlecan, qui aussi assure un support physique (197). Ce sont principalement les cellules endothéliales qui rendent la BHE particulière au niveau de la perméabilité, comparée au reste des vaisseaux en périphérie. Ces cellules reliées entre elles par des jonctions serrées (JS), principalement par la claudine-3 et claudine-5, sont non fenestrées contrairement à la majorité des cellules endothéliales périphériques. De plus, la sous-expression d'ICAM-1 (pour « *Intracellular adhesion molecule-1* ») par les cellules endothéliales de la BHE permet au SNC de garder son statut immunologique privilégié, en bloquant l'infiltration des cellules immunitaires périphériques. Les astrocytes couvrent plus que 99% des vaisseaux sanguins du SNC et assurent les échanges d'ions et de métabolites entre le SNC et le sang. Ainsi, ils secrètent du VEGF (pour « *Vascular endothelial growth*

factor ») et d'eNOS (pour « *Nitric oxide synthase 3* ») qui jouent un rôle dans la perméabilité et l'intégrité de la BHE (198). Les péricytes participent également au maintien de la BHE. Leur absence augmente la perméabilité de la BHE. Les études sur les modèles *in vitro* ont démontré que les péricytes participent à l'acquisition du phénotype spécialisé des cellules endothéliales de la BHE, en régulant l'expression des gènes chez ces dernières (199).

Durant l'EH, des médiateurs pro-inflammatoires sécrétés par des neurones, des astrocytes et des oligodendrocytes infectés par le VHS-1 et les microglies, induisent une surexpression de l'ICAM-I chez les cellules endothéliales de la BHE (200). Le TNF- α active le NF- κ B de la cellule endothéliale, qui se lie sur le promoteur d'ICAM-I et déclenche sa surexpression (201). Par la suite, l'interaction ICAM-I/LFA-1 (pour « *Lymphocyte function-associated antigen 1* ») facilite la diapédèse des leucocytes qui cause une infiltration leucocytaire accentuant l'inflammation. Cette interaction par les intégrines des cellules endothéliales modifie également la concentration calcique intracellulaire, qui induit un relargage de radicaux libres de nitriques oxydes (NO) *via* l'activation d'eNOS. L'activation de l'endothélium par les NOS induit une surproduction de monophosphate de guanosine cyclique (cGMP) affectant le cytosquelette *via* les kinases dépendantes de cGMP et altère la BHE (202). L'analyse du LCR provenant des patients atteints d'une méningite virale a révélé la présence des métalloprotéases matricielles (MMPs) ayant des effets directs sur la BHE (203). Les protéines des JS assurant le fonctionnement de la BHE contiennent un domaine de clivage de MMPs qui rend ces jonctions sensibles à la présence de ces endoprotéases. Les microglies, les macrophages et les neutrophiles infiltrants sont les sources principales de production de MMPs durant les infections. Il a été montré que les microglies activées durant l'EH secrètent MMP-2 et MMP-9 dans un modèle murin et que l'inhibition de l'expression de ces MMPs par de petits ARN interférents (pARNi) a amélioré l'état de la BHE. Des dérivés réactifs de l'oxygène (ROS), majoritairement produits par les microglies, peuvent induire une phosphorylation des JS et diminuer l'expression de ces dernières. De plus, les ROS induisent indirectement la production des MMPs clivant des JS et dérèglent la BHE (204, 205).

2. Reconnaissance du VHS-1

Les cellules des mammifères, immunes ou non immunes, utilisent plusieurs récepteurs de reconnaissance de motifs moléculaires (PRR : pour « *Pattern recognition receptor* ») afin d'assurer le déclenchement de la réponse immunitaire innée dans le cas de détection du non-soi. Les PRRs regroupent les TLRs (pour « *Toll-like receptors* »), les RLR (pour « *retinoic-acid-inducible gene-1 (RIG-I)-like receptors* »), les NLR (pour « *NOD-like receptor* »), les ALR (pour « *melanoma 2 (AIM2)-like receptors* »), les CLR (pour « *C-type lectin receptors* ») et des capteurs d'ADN intracellulaires comme le cGAS (pour « *Cyclic GMP-AMP synthase* ») (**Figure-11**).

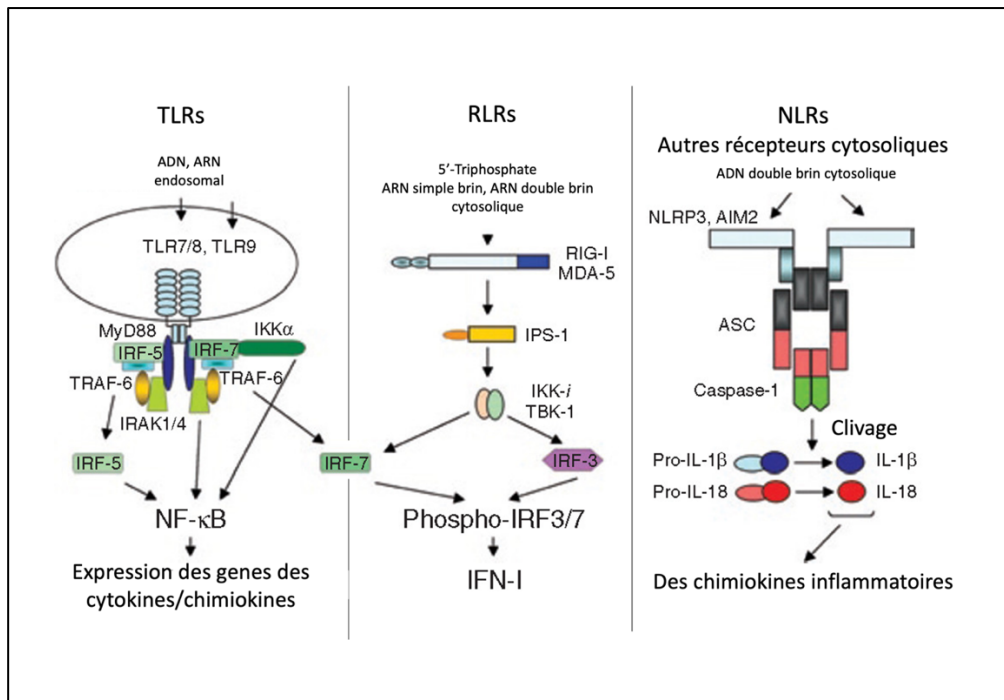


Figure-11 : Les classes de récepteurs de reconnaissance impliqués dans la reconnaissance des acides nucléiques viraux dans les cellules de mammifères.

(Adapté de (206)) : TLR : Récepteur de type Toll, RLR : Récepteur de type gène I inductible par l'acide rétinol ; NLR : Récepteur de type domaine d'oligomérisation des nucléotides.

2.1. Les TLRs

Les TLRs distinguent différentes molécules appartenant aux pathogènes (PAMP pour « *Pathogen-associated molecular patterns* ») et activent les deux voies de signalisation dépendantes de la réponse primaire de différenciation myéloïde 88 (MyD88) ou de l'IFN- β induisant un adaptateur contenant le domaine TIR (TRIF). Ces voies de signalisation activées modulent l'expression d'IFN-I (α et β) et plusieurs autres cytokines/chimiokines *via* le recrutement de facteurs de transcription activés tels que NF- κ B, AP-1 et de facteurs de régulation d'IRF-3 et -7. Il existe 10 sous-types de TLRs chez l'Homme et 12 sous-types de TLRs chez la souris. Les TLRs 1, 2, 4, 5, 6, 10 et TLRs 3, 7, 8, 9 se trouvent ancrés dans la membrane cellulaire ou endosomale, respectivement. Durant l'infection au VHS-1, trois différents PAMPs (pour « *Pathogen-associated molecular patterns* » composés de protéines virales, de l'ADN et de l'ARN viral, sont reconnus par TLR-2, -3 et -9 ayant de différentes localisations cellulaires (207).

Le TLR-2 se localisant sur la membrane cellulaire s'hétérodimérise avec le TLR-1 ou TLR-6. Le complexe TLR-1/2 est connu pour sa capacité de détecter les lipoprotéines virales, principalement gB et gH du VHS-1, durant l'entrée dans la cellule. Ainsi, il a été suggéré que TLR1/2 détecte l'ensemble protéolipidique des gB et gH ancrées dans la membrane cellulaire générée, une fois que le VHS-1 et la membrane cellulaire se sont fusionnés. Une augmentation de l'expression d'IRF (pour « *Interferon-regulatory factor* ») -3, IRF-7, IL-6 et IFN- β a été rapportée lors de l'internalisation du TLR-2 activée par le VHS-1 (208, 209). L'infection du SNC avec le VHS-2 et le CMV des souris déficientes en TLR-2 a montré que ces souris sont significativement plus sensibles à ces infections. Au contraire, l'absence de TLR-2 améliore le taux de survie dans un modèle murin d'EH néonatal en diminuant la réponse inflammatoire sans affecter les titres viraux. Le TLR-9 est aussi responsable de l'activation de production de l'IFN de type I *via* IRF-7. Les séquences d'ADN riches en guanine et cytosine étaient citées comme le motif principal reconnu par ce récepteur endosomal. Plus tard, il a été montré que les homopolymères de phosphodiester - 2' désoxyribose, sans les bases nucléiques, étaient ainsi capable d'induire son activation (210). La fusion du lysosome avec l'endosome contenant l'ADN du VHS-1 forme des endolysosomes et empêche la production des virions. L'étude de l'infection cornéenne par le

VHS-1 sur les souris déficientes en TLR-9 a montré que l'absence de ce récepteur cause une diminution de l'expression des ISGs et une augmentation des titres viraux (211).

Au cours de la réplication du VHS-1, le TLR-3 endosomale reconnaît les ARNdb (ARN double brins) et active la cascade de signalisation TRIF, IRF-3 et NF- κ B, qui initie la production d'IFN- β et de plusieurs autres médiateurs inflammatoires. Les gènes du VHS-1 se localisent sur les deux brins d'ADN. Quand la transcription des gènes chevauchants se fait à partir des sens opposés, des ARNm complémentaires commencent à s'accumuler et s'hybrider. Ce phénomène cause la formation des ARNdb qui activent le TLR-3 (212). Une déficience autosomale récessive du gène d'UNC93B1, interagissant avec le TLR-3, a été détectée chez deux enfants atteints d'EH (213). De plus, l'identification d'une mutation dominante négative sur le gène TLR-3, chez les fibroblastes et les leucocytes récoltés de deux autres enfants atteints d'une EH, a renforcé l'hypothèse qu'un TLR-3 fonctionnel reste crucial pour la protection contre cette infection du SNC. Cette substitution hétérozygote à la position 1660 (c.1660C>T) du gène TLR-3 conduit au remplacement d'une proline par une sérine à la position 554 (P554S), qui cause une diminution de production d'IFN- α/β et - λ chez ces patients (214).

2.2. Les RLRs

Les RLR sont responsables de la détection de l'ARNdb cytoplasmique durant une infection virale. La famille des RLR est composée de trois membres : RIG-I, MDA5 (pour « *Melanoma differentiation-associated protein 5* ») et LGP2 (pour « *Laboratory of genetics and physiology 2* »). Le domaine central d'hélicase et le domaine C-terminal, essentiels pour la détection d'ARNdb, sont les deux domaines communs dans tous les RLRs. L'induction de la réponse d'IFN-I, est potentiellement dépendante de MAVS (pour « *Mitochondrial antiviral-signaling protein* ») (215). Initialement, il a été suggéré que RIG-I reconnaît la structure secondaire d'ARN en « *épingle à cheveux* » ou les ARNdb qui sont générés durant la transcription des gènes chevauchants complémentaire du VHS-1, comme le TLR-3. Ensuite, il a été montré que RIG-I peut être aussi activé par le groupement de 5'-triphosphate de l'ARN simple brin synthétisé par l'ARN polymérase III. L'inhibition de RIG-I a arrêté la production d'IFN- β (216).

Un autre RLR, MDA5, a été cité comme le responsable majeur de l'induction d'IFN dans une étude *in vitro*. Suite à la déplétion du MDA5 par des pARNi, une baisse d'IFN- β and IFN- λ 1 a été rapportée (217). La LGP2 est aussi impliqué dans le contrôle de l'infection au VHS-1, mais son rôle exact reste toujours à clarifier. La LGP2 ayant plus d'affinité pour les ARNdb comparativement aux autres RLR, ell interagit avec la protéine Dicer, une endoribonucléase qui clive les fragments d'ARNdb afin d'obtenir des pARNi et des miARN. Il a été suggéré que le complexe LGP2/Dicer clive les pARNi générés pour altérer l'expression des gènes viraux chez les cellules mammifères et joue un rôle de régulateur négatif, en inhibant les voies de signalisation de RIG-I/MDA5 (218, 219). Une autre étude sur le rôle du LGP2 dans l'infection à picornaviridae chez la souris exprimant LGP2-tronquée sans le domaine ATPase, a montré que LGP2 non fonctionnel inhibe la réponse d'IFN de type I, ce qui montre son rôle essentiel dans le combat des infections (220).

2.3. Les NLRs

Les NLRs sont des PRRs cytoplasmiques qui détectent les pathogènes intracellulaires ou bien des signaux du danger endogènes. Les NLRs sont composés de trois régions majeures : un domaine N-terminal effecteur interagissant avec une famille de molécules impliquées dans d'autres voies de signalisation (les trois domaines : CARD (pour « *the caspase recruitment domain* »), PYD (pour « *pyrin domain* ») ou BIR (pour « *baculovirus inhibitor repeat* »), un domaine NACHT ayant une activité ATP/GTPase qui assure l'auto-oligomérisation et un domaine C-terminal activateur, composé d'un nombre variable de répétitions riches en leucine (LRR pour « *Leucine-rich repeat* »), qui détecte différents PAMPs. Il existe plus que 20 membres dans la famille des NLR. Chacun de ces membres contenant un domaine effecteur et/ou activateur différent est activé *via* différents signaux de danger (221). Suite à la détection du PAMP, les NLR peuvent s'oligomériser entre eux et activer des facteurs de transcription, tels que NF- κ B. De plus, certains des membres, comme le NLRP1 et NLRP3, déclenchent la formation de l'inflammasome, un complexe protéique responsable du clivage de certains médiateurs inflammatoires inactifs, tels que la pro-IL-1 β et pro-IL-18, permettant à ces derniers de devenir actifs (222).

La NLRP3 est connue pour être impliquée dans la réponse inflammatoire durant l'infection au VHS-1. L'étude de la kératite herpétique chez la souris déficiente en NLRP3^{-/-}

a montré une augmentation des titres viraux accompagnée d'une réponse inflammatoire exacerbée. De plus, les concentrations d'IL-1 β bioactive étaient significativement plus faibles chez ces souris comparativement aux souris sauvages (223). Ainsi, il a été montré que le VHS-1 active la formation de l'inflammasome NLRP3 dans les fibroblastes de prépuce humain (224). Contrairement à ces derniers, il existe aussi des études qui montrent que les RLRs inhibent la réponse immunitaire innée. Il a été montré que les souris NLRP3^{-/-} déficientes infectées par le VHS-1 survivaient plus et produisaient plus d'IFN- β et IL-6. Cette observation a été expliquée par l'inhibition de STING qui active la réponse d'IFN-I suite à la détection de l'ADN du VHS-1 par son interaction avec la NLRP3 (225).

2.4. Les autres récepteurs cytosoliques

Le génome du VHS-1 placé au sein du noyau de la cellule eucaryote est détecté par une multitude de molécules appelées « *les récepteurs d'ADN cytosoliques* ». Aujourd'hui, il est connu que ces récepteurs sont capables de détecter divers PRRs incluant l'ADN viral dans le noyau, comme dans le cytoplasme, contrairement à ce qui a été suggéré précédemment (226).

Le DAI (pour « *DNA-dependent activator of IFN-regulatory factor* »), la cGAS et l'IFI16 (pour « *IFN- γ -inducible protein* ») font parties de cette famille de molécule activant majoritairement la production des IFN de type I *via* l'axe STING-TBK1 (pour « *TANK-binding kinase 1* ») au cours d'une infection herpétique. Le STING active la TBK1 qui phosphoryle l'IRF-3. Suite à la phosphorylation, l'IRF-3 se dimérise et se transloque au noyau pour déclencher la production d'IFN- β . Ainsi, il existe d'autres voies indépendantes de l'axe STING pour lesquelles plusieurs de ces récepteurs participent.

Le DAI, le premier récepteur cytosolique rapporté, reconnaissant le génome du VHS-1, se lie sur l'ADN et active la production d'IFN de type-1 *via* TBK-1. Il a été montré que l'infection *in vitro* des microglies et des astrocytes par le VHS-1 induit une surexpression du DAI. La déplétion de ce dernier a mené une inhibition de la production de plusieurs cytokines/chimiokines inflammatoires (227). Une autre étude a confirmé l'implication du DAI dans le contrôle de l'infection au VHS-1 en démontrant la sensibilité élevée des fibroblastes embryonnaires exprimant des ARNs d'interférence pour DAI (228).

La cGAS se lie à l'ADN étranger et forme un dimère. Ensuite, il catalyse la synthèse de cGAMP, qui interagit avec STING. Ce dernier dimérisé phosphorylé peut interagir soit avec la TBK1, soit avec l'IKK (pour « *inhibitor of nuclear factor kappa B (IκB) kinase* ») et activer deux différentes voies de signalisations. Ensuite, la TBK1 et l'IKK interagissent avec le NF-κB et l'IRF-3, respectivement, qui sont transloqués au noyau afin d'activer l'expression d'IFN-I et plusieurs autres cytokines/chimiokines inflammatoires. En effet, les souris déficientes en cGAS ont eu plus de mortalité avec moins de production d'IFN-I au cours de l'EH (229).

La recherche sur l'IFI16 (p204 chez la souris) a permis, pour la première fois, de montrer que ces récepteurs à ADN cytosoliques, fonctionnent autant dans le noyau que le cytoplasme. Tout d'abord, il a été suggéré que l'IFI16 reconnaît l'ADN viral libre dans le cytosol. Une étude sur les cellules exprimant IFI16 tronqué, incapable de se transloquer au noyau, a montré que ce récepteur induit la réponse d'IFN-β qu'à partir du noyau. Sa déplétion a inhibé la translocation de NF-κB et IRF-3 dans le noyau au cours de l'infection au VHS-1 (230, 231).

3. Le déclenchement de la réponse antivirale

La réponse antivirale se déclenche à l'aide de l'activation de trois voies de signalisations, soit les voies de NF-κB, des IRFs et les MAPKs (pour « *mitogen-activated protein kinases* »). Ces voies de signalisation pilotent l'expression de l'IFN-I et l'expression ultérieure des ISGs, nécessaires pour limiter l'infection (**Figure-12**).

La stimulation de la cellule *via* les PRRs ou bien les récepteurs des cytokines/chimiokines comme les récepteurs de TNF-α induit l'activation du complexe NF-κB se trouvant dans un état inactif dans le cytoplasme. Différentes molécules intermédiaires, comme les IRAKs (pour « *interleukin-1 receptor (IL-1R) associated kinase* ») et les IKKs, conduisent à la dégradation d'IκB (pour « *IκappaB kinase* ») attaché aux formes inactives du NF-κB, qui est nécessaire pour l'activation du NF-κB. Une fois activé, le facteur de transcription peut se transloquer au noyau pour activer la transcription de plusieurs gènes. Les mutations sur le NEMO (IKK-γ), impliqué dans l'activation du NF-κB, ont révélé que le dysfonctionnement de la voie de signalisation du NF-κB perturbe la production d'IFN-β,

d'IFN- λ et d'IL-6. Les patients avec ces mutations sont plus vulnérables à l'infection du SNC par le VHS-1 (232).

Les IRFs sont également essentielles pour la réponse anti-herpétique. Le dimère d'IRF-3 active la production d'IFN- β et aussi l'expression d'IRF-7. Ce dernier se dimérise et active une surproduction d'IFN- β . L'inhibition de la production d'IFN- α et - β chez la souris IRF-3^{-/-} atteintes d'EH a causé l'augmentation de la mortalité. De plus, une augmentation des titres viraux cérébraux, accompagnés d'une hausse de la production des cytokines inflammatoires, a été observée (233). Une étude a confirmé que la déplétion d'IRF-3 rend les souris plus susceptibles à l'infection au VHS-1, mais a rapporté que la souris IRF-7^{-/-} était plus vulnérable que la souris IRF-3^{-/-}. La même étude a démontré que la capacité migratoire des cellules dendritiques IRF3^{-/-} est diminuée, ce qui peut également perturber le contrôle de l'infection (234).

L'autre voie de signalisation impliquée dans la réponse inflammatoire durant les infections au VHS est la voie des MAPKs incluant les trois voies majeures qui sont la voie d'ERK (pour « *Extracellular signal-regulated kinase 1/2* »), de JNK (pour « *c-Jun N-terminal kinases* ») et de p38 (pour « *p38 mitogen-activated protein kinase* »). Ces régulateurs de transcription forment des complexes avec les facteurs de transcription qui déclenchent l'expression des médiateurs inflammatoires. Par exemple, le JNK phosphorylé active l'oncogène c-Jun, qui forme le complexe AP-1 (235). L'infection au VHS-1 stimule également les voies de JNK et p38. Il a été également rapporté que le VHS-1 augmente l'activité de c-Jun et aussi d'AP-1. De plus, l'ICP0 du VHS-1 semble d'être responsable de cette activation (236, 237).

L'implication de ces voies de signalisations est étudiée dans le contexte d'EH à l'aide de plusieurs modèles de souris déplétées de molécules impliquées dans ces voies (238). Par exemple, les souris TRIF^{-/-} et MAVS^{-/-} ont permis de mettre en évidence l'importance de ces molécules adaptatrices en montrant l'augmentation du taux de mortalité de ces deux lignées de souris, par rapport aux souris sauvages. Ces molécules adaptatrices, recrutées à la suite de la reconnaissance du matériel génétique du VHS-1 par des senseurs cytoplasmiques, servent à activer les IRFs. La diminution de la phosphorylation d'IRF-3 et -7 chez ces souris provoque la diminution de la production d'IFN- β , qui cause l'augmentation des titres viraux

dans le cerveau (239). Tels que décrit précédemment, l'activation de ces voies conduit principalement à la production des IFNs. Ces derniers se lient aux récepteurs d'IFN de type-I, les récepteurs de l'IFN-I (IFNAR1/2), qui activent l'expression des ISGs *via* l'intermédiaire de la voie JAK (pour « *janus kinase* »)/STAT (pour « *Signal Transducers and Activators of Transcription* ») (238). Les souris exprimant Stat1 tronquée et les souris IFN $\alpha\beta\gamma$ R^{-/-} ont développé une EH à la suite de leur infection périphérique au VHS-1 (240). Ces résultats ont fait remarquer l'importance de cette voie de signalisation dans le contrôle des infections au VHS-1.

La production de plusieurs types d'ISGs, tels que la MxB (pour « *Human myxovirus resistance protein B* »), l'ISG15 (pour « *Interferon-stimulated gene product 15* »), la PKR (protein kinase R), l'OAS (pour « *2'-5'-oligoadenylate synthetase* ») et la RNaseL (pour « *Ribonuclease L* »), induite par les IFNs, est un élément incontournable de la réponse antivirale incluant celle contre le VHS-1 (241). Il a été rapporté que la souris déficiente en ISG15, qui est une protéine de type ubiquitine se conjugant aux protéines pour induire des modifications post-traductionnelles, était plus susceptible à l'infection au VHS-1 (242). Une autre étude *in vitro* a révélé que la transcription du gène d'*IFN- β* chez les cellules des NT en culture a induit une surexpression de PKR et d'OAS au cours de leur infection au VHS-1. La déplétion de chacune de ces deux molécules a induit une augmentation de la charge virale (243).

4. La réponse immunitaire des cellules du SNC

4.1. La réponse neuronale

Les neurones, contrairement à ce qui a été accepté dans le passé, ne sont pas des cellules immunoprivilégiées à l'abri de la réponse immunitaire du soi. Ces cellules participent activement à la réponse immunitaire intrinsèque, mais aussi innée, contre le VHS-1. De plus, des différences dans la réponse immunitaire sont observées en fonction des sous-types des neurones infectés (244). Cette différence de la réponse immunitaire est également présente entre les modèles animaux d'EH inoculés par de différentes voies d'administration, ce qui peut être partiellement expliqué par de différents sous-types de neurones infectés.

L'EH est déclenchée par l'infiltration du parenchyme cérébral par le virus *via* les nerfs sensitifs. Le virus infecte d'abord l'axone des neurones innervant l'épithélium. Ces premiers neurones infectés transportent la capside contenant l'ADN viral jusqu'au noyau *via* leur système de microtubules. Le VHS-1 induit la même réponse qu'une lésion axonale chez les neurones infectés et stimule la production de nouvelles protéines telles qu'Annexine A2, peripherin et plusieurs autres protéines régulatrices de dynéines. L'ensemble de ces protéines, majoritairement impliquées dans le cytosquelette et le transport nucléaire, situées au point d'entrée du virus, favorisent un meilleur transport rétrograde (245). Dès l'étape de transport rétrograde du virion, la réaction immunitaire des neurones s'initie par la phosphorylation de Stat1 au niveau axonal afin d'inhiber l'infection (246).

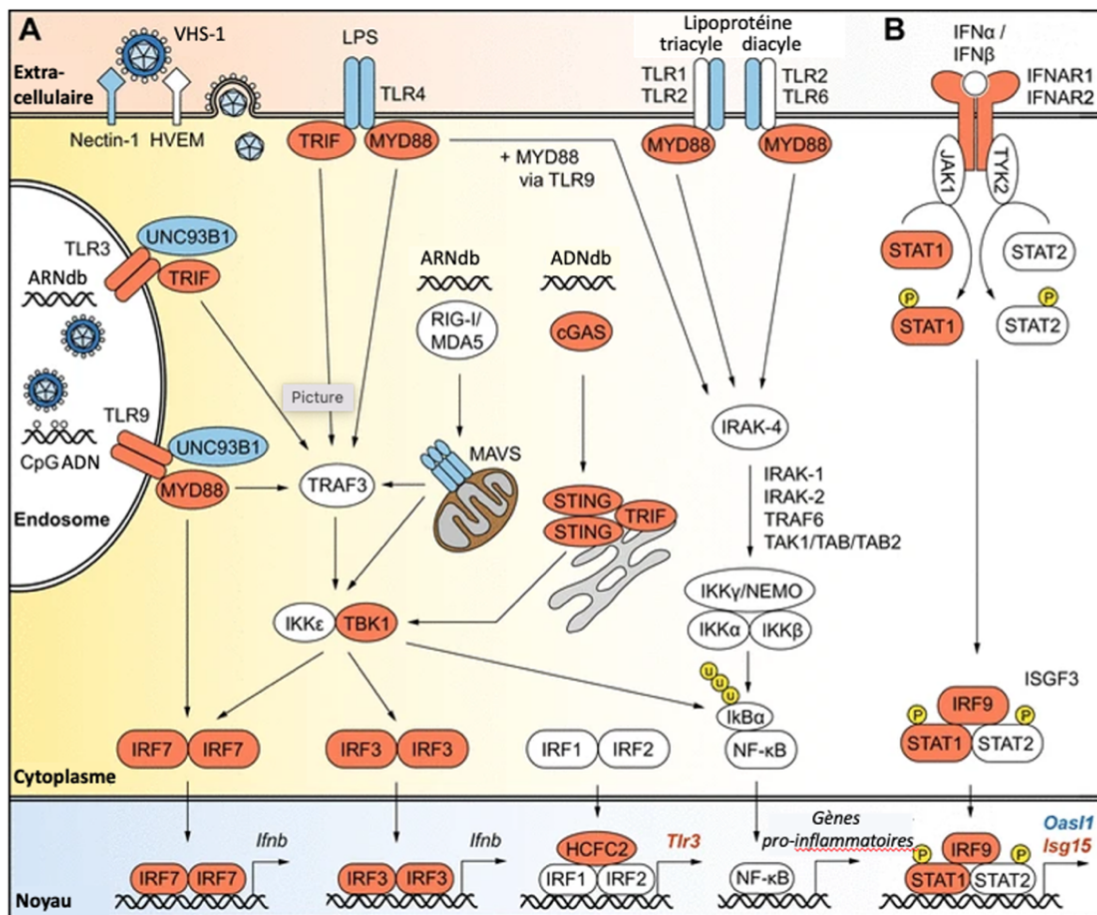


Figure-12 : Les voies de signalisation impliquées dans la réponse cellulaire intrinsèque au cours de l'EH chez la souris.

Adapté de (238) : (A) Avant l'entrée du VHS-1, les TLRs à la surface cellulaire détectent la présence du VHS-1 (TLR1/2, TLR2/6 et TLR4). À la suite de l'entrée du VHS-1, les acides nucléiques viraux sont reconnus par les TLRs dans les endosomes (TLR3 et TLR9). Il existe des senseurs d'ADN cytoplasmique comme cGAS/STING et des senseurs d'ARN comme RIG-I/MDA5 qui déclenchent la réponse immunitaire. Ces PRR initient la signalisation via des facteurs, tels que MYD88, TRIF et TBK1 et favorisent la transcription d'IFN-I et des gènes pro-inflammatoires, via les facteurs de transcription IRF-3, IRF-7 et NF- κ B. (B) La production ultérieure d'IFN- α et d'IFN- β et l'engagement du IFNAR1/2 initient la signalisation JAK/STAT déclenchant l'expression des ISGs qui établissent un état antiviral protecteur dans la cellule infectée.

Ces cellules détectent le virus par des PRR et ensuite régulent l'expression de plusieurs gènes. Un des PRR exprimés chez les neurones est le TLR-3. La déficience de TLR-3 chez les neurones augmente leur susceptibilité à l'infection *in vitro* par VHS-1 (247). Les neurones infectés produisent plusieurs médiateurs inflammatoires, incluant les l'IFN- α/β qui fonctionnent de façon autocrine en altérant les voies métaboliques du soi et ensuite de façon paracrine en modulant celles des cellules voisines. Selon une étude *in vitro* sur les neurones isolés des souris déficientes pour STING, IRF-3, IRF-7, IFN- $\alpha\beta\gamma$ R (pour « *type I and II interferon receptors* ») ou STAT1, la réponse intrinsèque à l'IFN-I n'est pas suffisante pour une protection efficace contre le VHS-1. Les neurones déficients pour une de ces molécules participant à la réponse d'IFN produisent la même quantité de virions VHS-1 que ceux isolés de souris sauvages. Ainsi, ils ont pu observer que le traitement exogène de ces cellules par IFN- α ou β instaurait la réponse antivirale (247). Une autre recherche souligne l'absence de production d'IFN durant l'infection au virus de la stomatite vésiculaire (VSV). Ces données suggèrent d'abord que toutes les sous-familles de neurones ne sont pas capables de produire ces médiateurs et que l'effet antiviral insuffisant induit par ces molécules pourrait être dû aux facteurs cellulaires et non au détournement des voies de signalisations de la production d'IFN par le VHS-1 (248).

La voie JAK/STAT activée par l'IFN-I conduit à la production de plusieurs ISGs, des molécules avec des fonctions antivirales telles que RNase L (pour « *Ribonuclease L* ») et PKR (pour « *Protein kinase R* »), qui dégradent et bloquent la traduction de l'ARN viral,

respectivement (249). D'après une étude, l'infection *in vitro* avec le VHS-1 de cellules neuronales isolées de ganglions spinaux de souris induit une faible augmentation de l'expression de *Mx1* (pour « *MX Dynamin Like GTPase 1* »). Ils ont aussi montré que les cellules mitotiques sont plus sensibles aux IFNs comparés aux neurones et que ces cellules contrôlent mieux la réplication virale (250). Cette faible activation de l'immunité neuronale est aussi causée par le VHS-1 inhibant plusieurs voies de signalisations par des molécules virales, comme l'ICP34.5, synthétisé au cours de la réplication virale.

Durant les infections herpétiques incluant l'EH, plusieurs cellules immunitaires sont recrutées aux sites de l'infection. En plus de la réponse immunitaire intrinsèque neuronale, les neurones interagissent avec ces cellules immunitaires infiltrantes ou bien résidentes par contact direct ou *via* les médiateurs inflammatoires et régulent la réponse de ces dernières. Les résultats d'une étude sur un modèle d'infection cutanée au VHS-1 chez la souris déficiente de neurones sensitifs Nav_{1.8}⁺ ont montré l'implication de ces neurones dans le contrôle de l'infiltration des neutrophiles dans les lésions causées par l'infection. L'absence de ces neurones a induit une infiltration de neutrophiles plus importante, ce qui a provoqué une aggravation des lésions. La déplétion des neutrophiles a causé une diminution des tailles des lésions cutanées et a permis de mieux contrôler l'infection. De plus, ils ont rapporté une diminution du nombre de LT spécifiques au VHS-1 dans les ganglions lymphatiques de la souris déficiente en neurones Nav_{1.8}⁺, soulignant l'importance de la réponse immunitaire neuronale dans la réponse immunitaire adaptative (251).

Une des stratégies exploitées par des neurones infectés est l'autophagie, le processus d'autolyse, qui se fait par la fusion des lysosomes et des autophagosomes enclavant les organelles, que l'on appelle le cargo. Les cellules post-mitotiques, telles que les neurones, incapables de se diviser, ne sont pas en mesure de diminuer la quantité d'agrégats protéiques ou de débris cellulaire. En cas de perte d'homéostasie, ces cellules rentrent en autophagie afin d'éviter le mal fonctionnement de la cellule qui peut affecter le fonctionnement de tout le SNC. Il a été montré que ce mécanisme est également exploité pour combattre et limiter les infections virales. L'autophagie n'est pas seulement limitée à la lyse des protéines du soi, mais elle regroupe plusieurs autres mécanismes sélectifs d'autophagie, tels que la mitophagie, l'aggréphagie, la lipophagie, la virophagie etc, utilisés afin de cibler

spécifiquement des composants du non-soi. Au cours de l'autophagie sélective, le cargo est guidé à l'aide de l'interaction des récepteurs membranaires ayant le domaine LIR (pour « *LC-3 interacting region* ») avec les protéines impliquées dans l'autophagie (par exemple, ATG (pour « *Autophagy-related genes* »)). Certains virus, comme le VHS-1, exploitent les endosomes afin de se rendre à l'intérieur de la cellule hôte, à la suite de la fusion des glycoprotéines virales avec la membrane cellulaire. A l'aide de plusieurs protéines et de l'ATG, ces endosomes se fusionnent avec les lysosomes afin de dégrader le virus. Les protéines virales produites, issues de la dégradation, peuvent être couplées avec un des CMH et se rendent à la membrane des cellules pour participer à la réponse immunitaire (252).

L'autophagie semble être une des voies principales impliquées dans la réponse antivirale neuronale contre l'infection au VHS-1. Contrairement aux cellules mitotiques, l'inhibition de l'autophagie chez les neurones isolés des souris déficientes en Atg5 a conduit à une augmentation significative des titres viraux (250). Une étude *in vitro* sur les neurones a montré que l'infection de ces cellules par le VHS-1 induit une augmentation du nombre de mitochondries en fission et la production de ROS, ce qui souligne que l'infection affecte directement le fonctionnement des mitochondries (253). Il a été suggéré que ce fonctionnement altéré des mitochondries crée un environnement favorable pour la production virale et que les neurones infectés essaient de limiter l'infection en utilisant la mitophagie afin d'éliminer ces mitochondries favorisant l'infection. De plus, une diminution d'ADN et de protéines dans les tissus cérébraux obtenus chez des patients atteints d'EH renforcent l'hypothèse de la mitophagie comme mécanisme de défense (254).

4.2. La réponse des cellules gliales du SNC

Les cellules gliales regroupent les cellules précurseurs d'oligodendrocytes, les oligodendrocytes, les astrocytes et les microglies. Le seul rôle attribué à ces cellules était le maintien physique de l'ensemble des neurones, tels que leur nom « *glie* » indique (de la colle, en grecque). Aujourd'hui, on sait que ces cellules sont des acteurs majeurs dans le maintien de l'homéostasie et de la défense du SNC. Grâce aux nouvelles méthodes de la génomique, on est actuellement capable de les faire exprimer des protéines fluorescentes pour pouvoir les visualiser, ou bien de les éliminer afin de mieux caractériser leur rôle (255).

4.2.1. Les cellules précurseurs d'oligodendrocytes

Les cellules précurseurs d'oligodendrocytes, autrement dit, des glies NG2 (pour « Nerve/glial antigen 2 »), représentent une population neuronale distincte des oligodendrocytes. L'expression du NG2 qui est un peptidoglycan sur la membrane, permet de les différencier des autres glies. L'appellation de précurseur d'oligodendrocytes devient de moins en moins utilisée, car ces glies-NG2 ayant plusieurs différentes fonctions, sont également capable de se différencier en d'autres cellules du SNC, telles que des neurones ou des astrocytes (256). Elles se trouvent dans la substance blanche et grise du cerveau. Celles qu'on trouve dans la substance grise restent souvent dans un état indifférencié. À la suite de leur activation, elles migrent, se différencient et repeuplent les régions endommagées du cerveau. Cependant, le nombre élevé des glies NG2 indifférenciées dans la maladie de SP, a mis leur rôle de réservoir d'oligodendrocytes en question (257). Cette observation pourrait être expliquée par la présence de plusieurs cytokines/chimiokines dans le SNC, telles qu'IL-1 β et IL-6, souvent retrouvées durant les maladies neurodégénératives, qui inhibent la capacité des glies NG2 à se diviser et à se différencier (258).

À l'heure actuelle, il est accepté que les glies NG2 réagissent contre les éléments perturbateurs de l'homéostasie du SNC. Cependant, leur rôle reste très peu exploré dans le contexte de la neuroinflammation, comparé à celui des astrocytes et des microglies. Dans le contexte des infections du SNC, certains changements morphologiques indiquant une hypertrophie, tels que le corps cellulaire et les prolongements élargis, souvent observés sur les autres glies, ont été rapportés pour ces glies NG2 dans un modèle de souris d'encéphalomyélite au virus murin Theiler's (TMEV). De plus, un nombre plus important de glies NG2 exprimant Ki-67, une protéine nucléaire associée à la prolifération cellulaire, dans l'hippocampe des souris infectées au TMEV, a confirmé que ces glies réagissent contre l'infection du SNC (259).

4.2.2. L'oligodendrocyte

Les oligodendrocytes assurent la myélinisation d'une partie des axones de plusieurs neurones du SNC. Ils résultent d'un long et complexe processus de différenciation des oligodendrocytes progéniteurs. L'oligodendrocyte endommagé entraîne la démyélinisation, qui altère le circuit électrique chez le neurone et cause des maladies neurodégénératives

démyélinisantes comme la sclérose en plaque (255, 260). Ce phénomène de démyélinisation a été observé dans la plupart des infections du SNC, incluant l'infection au VHS, qui cause souvent des paralysies (261). Plusieurs types d'herpèsvirus, tels que EBV, HHV-6 et aussi le VHS-1 ont été montrés comme l'agent responsable de ce phénomène qui cause la SP. Il a été montré que les oligodendrocytes de plusieurs patients atteints de SP exprimaient des antigènes du HHV-6 (262). Cela suggère que la démyélinisation pourrait être due à la mort de ces oligodendrocytes, qui serait provoquée par l'immunité dirigée contre les antigènes viraux exprimés par ces cellules. Chez la souris, il a été montré que les zones du SNC riches en oligodendrocytes, survivants de l'infection au virus murin d'hépatite (MHV pour « *Murine hepatitis virus* »), constituaient les zones les plus démyélinisées. Ces oligodendrocytes survivants avaient augmenté l'expression du CMH-I, ce qui favorise une réponse LT CD8⁺ cytotoxique (263). Une autre explication pour la démyélinisation souvent rencontrée dans les infections au HHV-6 est le mimétisme moléculaire causé par les sept chaînes d'acide aminé identiques partagées entre U24 du HHV-6 et la MBP (pour « *myelin basic protein* »). Dans un autre modèle de SP, ces cellules ont acquis un phénotype phagocytaire, exprimé le CHM-II et participé à l'induction de la réponse LT CD4⁺ mémoire (264).

L'oligodendrocyte est susceptible à l'infection au VHS-1 et présente un des facteurs majeurs qui détermine la prédisposition de développer l'EH. À la suite de leur infection, comme toutes les autres cellules, les oligodendrocytes ont altéré l'expression de plusieurs gènes impliqués dans la réponse inflammatoire. Les TLR-2 et -3 sont les seuls TLRs exprimés par les oligodendrocytes. La stimulation de ces TLRs active NF-κB, régule plusieurs fonctions des oligodendrocytes, incluant la production de cytokines/chimiokines, telles qu'IL-1β, IL-6, CCL2 (pour « *chemokine (C-C motif) ligand 2* »), CCL3, etc., mais aussi de facteurs neurotrophiques comme le NGF (pour « *Nerve growth factor* ») (255, 264). Une étude a montré que les oligodendrocytes obtenus des différents individus répondaient de façon différente à l'infection au VHS-1 dans des conditions *in vitro*. Ces résultats soulignent l'importance des facteurs génétiques de l'hôte ayant un impact sur la réponse immunitaire intrinsèque de ces cellules contre le VHS-1, selon les auteurs (265). Il a été montré que les enfants souffrant d'une déficience autosomale récessive du gène codant la protéine UNC93B, située sur le réticulum endoplasmique (RE), étaient plus sensibles aux infections, tels que

mentionnés précédemment. L'absence de cette protéine perturbe le recyclage des TLR-3, -7 et -9 du RE à l'endosome et inhibe la production d'IFN (213). Une équipe a étudié l'effet de l'infection sur différentes cellules obtenues de la différenciation des précurseurs neuronaux UNC93B^{-/-}. Leur résultat a indiqué que les neurones et les oligodendrocytes étaient les deux populations cellulaires les plus vulnérables contre l'infection au VHS-1 et qu'ils produisaient plus de virus comparés aux astrocytes et aux microglies (247). À la lumière de tous ces résultats, on peut conclure que la réponse immunitaire de l'oligodendrocyte contre le VHS-1 est un facteur qui pourrait déterminer la sévérité de l'infection.

4.2.3. L'astrocyte

L'astrocyte, originant de cellules neuronales progénitrices, est la population cellulaire la plus abondante du SNC et forme 50 % du volume total du cerveau humain. Ces cellules sont en contact avec les autres glies et les neurones, ainsi qu'avec des cellules périvasculaires, des fibroblastes méningés et des cellules immunitaires en périphérie. Il est estimé que 99% des vaisseaux cérébraux sont couverts de ces cellules, qui participent au maintien de la BHE. Les astrocytes captent du glucose du sang *via* leurs prolongements. À la suite de l'utilisation du glucose, ils produisent et libèrent du lactate, nécessaire pour la survie neuronale. Ainsi, ils participent au remodelage des synapses et assurent la plasticité cérébrale (266). L'élimination des synapses *via* la phagocytose par les astrocytes est sous contrôle de deux voies de signalisation qui sont MEGF10 (pour « *Multiple EGF Like Domains 10* ») et MERTK (pour « *MER Proto-Oncogene, Tyrosine Kinase* ») (267). L'activité neuronale peut être également modulée par les astrocytes capables de changer la concentration de Ca²⁺ dans le SNC. De plus, ces glies jouent un rôle crucial dans le recyclage du glutamate. Ce neurotransmetteur libéré dans l'espace intersynaptique par les neurones est récupéré par l'astrocyte et converti en glutamine. Il a été montré que le dysfonctionnement des astrocytes peut causer un excès de glutamate, ce qui induit de l'excitotoxicité neuronale. Elles secrètent également du BDNF (pour « *brain-derived neurotrophic factor* ») et des cytokines anti-inflammatoires, comme le TGF (pour « *Tumor growth factor* »)- β , afin de maintenir le SNC en état homéostatique (268).

Ces cellules exprimant les TLRs et les CTLR (pour « *C-type lectin-like receptor* »), détectent la présence du virus et s'activent. L'astrocyte réactif devient hypertrophique et

surexprime la GFAP (pour « *glial fibrillary acid protein* »). Les astrocytes, mis en culture et infectés par TMEV, augmentent significativement la production de TNF, IL-1 β et aussi IFN-I. L'infection des souris par le MHV a démontré que la production d'IFN- β était significativement plus importante comparée à celle d'IFN- α et que ce sont les microglies, et pas les neurones et les astrocytes, qui l'ont secrété (269). Une partie des astrocytes réactifs commencent à proliférer à la suite de la détection du danger, ce qu'on appelle l'astrogliose. Ce phénomène est souvent initié par des molécules, telles que l'IL-1 β , IL-6 et TNF- α produites par les microglies réactives et se déroule au bord, et non au sein, de la région endommagée (270). Il a été montré que ces astrocytes en prolifération peuvent devenir des cellules multipotentes capables de se différencier aux autres cellules neurales et gliales, qui remplaceraient les cellules endommagées du SNC (271).

Les astrocytes réactifs augmentent leur capacité phagocytaire et surexpriment des marqueurs de phagocytose, tels que le CD68. Dans un modèle d'ischémie cérébrale, la surexpression d'ABCA1 (pour « *ATP Binding Cassette Subfamily A Member 1* »), MEGF10 et de GULP1 (« *GULP PTB Domain Containing Engulfment Adaptor 1* »), nécessaires pour la phagocytose, a montré que ces cellules participaient directement à la clairance des cellules endommagées (272). Une autre étude a suggéré qu'en cas d'absence microgiale, les astrocytes sont responsables de compenser le manque d'activité phagocytaire nécessaire pour éliminer les cellules du SNC infectées par le virus Zika (ZIKV pour « *Zika virus* ») (273). À la suite de la phagocytose, ces cellules participent à la présentation d'antigène *via* CMH-I et II et modulent la réponse immunitaire adaptative (274). Ces cellules sont les producteurs majeurs du CXCL10, crucial pour le recrutement des LT, dans le parenchyme cérébral (275). Actuellement, les astrocytes réactifs sont considérés comme des cellules impliquées dans la coordination de la réponse lymphocytaire.

Les astrocytes sécrètent une multitude de protéines, telles que des facteurs de croissance, des cytokines/chimiokines et des MMPs, qui augmentent la perméabilité de la BHE en lysant les protéines des JS (les occludines, les claudines, les JAM (« *junctional adhesion molecules* »), etc.), majoritairement exprimées par des cellules épithéliales et endothéliales (276). La production de MMP-9 par les astrocytes réactifs était observée au cours de l'infection par différents virus, comme le virus du Nil occidental (WNV pour

« *West-Nile virus* »)), le virus de l'encéphalite japonaise (JEV pour « *Japanese encephalitis virus* »)) ou bien le VIH-1. Il a été également montré que cet enzyme a diminué l'étanchéité de la BHE dans le SNC infecté. La MMP-9 peut avoir un effet inhibiteur sur les cellules productrices de médiateurs pro-inflammatoires. La déplétion du IFNAR spécifiquement chez l'astrocyte inhibe l'activation astrocytaire et diminue la production des médiateurs pro-inflammatoires qui induit indirectement une baisse de production du MMP-9, ce qui permet de protéger la BHE (270).

À la suite de l'infection *in vitro* des astrocytes par le VHS-1, ces derniers produisent de nouveaux virions, ce qui suggère une infection « *permissive* ». Contrairement à l'infection *in vitro* de ces cellules avec CMV, celle avec VHS-1 n'a induit aucune hausse dans les quantités de cytokines/chimiokines retrouvées dans le surnageant de culture, jusqu'à 48 h post infection (277). Ces résultats ont montré que les astrocytes, incapables de combattre l'infection, sont des cellules hôtes idéales pour le VHS-1. En plus de cela, il a été montré que l'astrocyte infecté semble favoriser l'infection des neurones *via* l'activation de l'expression GSK-3B (pour « *Glycogen synthase kinase 3 beta* ») chez les neurones, nécessaire pour l'adsorption du VHS-1. La liaison du VHS-1 sur les protéoglycans du SH de l'astrocyte conduit à l'augmentation de Ca^{2+} intracellulaire médié par IP3-dépendant phospholipase C, qui induit le relargage de l'ATP extracellulaire. Les ATP libérées se lient sur le « P2 receptor » (pour les récepteur P2 purinergique) des neurones voisins et accélèrent l'augmentation de Ca^{2+} intracellulaire. Des concentrations élevées de Ca^{2+} dans les neurones activent l'expression de GSK-3B qui favorise l'entrée et le transport du virus vers le noyau (278). Une autre étude récente a montré la co-localisation du signal CXCL1 et GFAP, suggérant que les astrocytes dans le SNC des souris infectées par le VHS-1 produisent du CXCL1. La même équipe a démontré qu'IL-1 produit par la microglie est primordial pour l'activation des astrocytes qui, à la suite de leur activation, produisent du CXCL1 impliqué dans le recrutement des neutrophiles aggravant la réponse inflammatoire dans l'EH (279). D'après tous ces résultats, la réponse astrocytaire peut alors avoir un impact négatif dans le contrôle de l'infection et de l'inflammation (**Figure-13**).

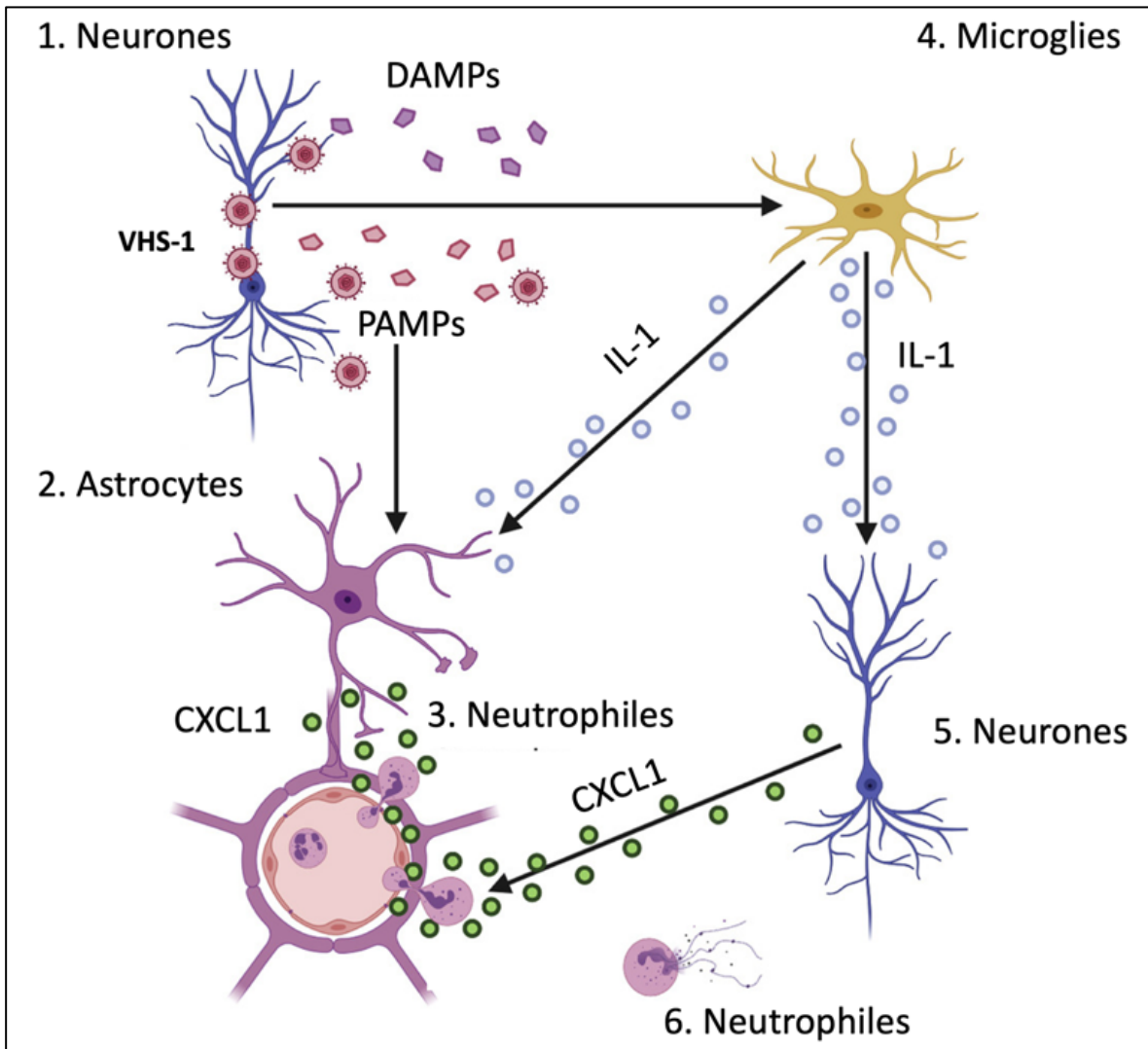


Figure-13 : La CXCL1 dérivée d'astrocytes et de neurones entraîne la transmigration des neutrophiles et perturbe la perméabilité de la BHE dans l'EH.

Adapté de (279) : La CXCL1 est produite par les astrocytes en réponse au VHS-1 et par les astrocytes et les neurones en réponse à l'IL-1 α . Ce dernier semble être le ligand critique requis pour la migration transendothéliale des neutrophiles, qui est en corrélation avec la dégradation de la BHE. Ainsi, l'axe CXCL1-CXCR2 représente une cible thérapeutique de choix pour limiter la morbidité médiée par les neutrophiles dans l'EH.

4.2.4. La microglie

4.2.4.1. L'origine de la microglie

La première observation des microglies a été faite par Franz Nissl à la fin du dix-neuvième siècle. Franz Nissl a rapporté que ces cellules étaient capables de migrer, se diviser et phagocyter. Plus tard, Santiago Ramon y Cajal a renommé ces cellules "Le troisième élément du SNC", afin de les distinguer des neurones et des neuroglies, le terme utilisé pour la première fois en 1856 par Virchow pour regrouper les macroglies ; les oligodendrocytes et les astrocytes. Il a aussi mentionné qu'elles sont potentiellement issues du mésoderme. L'étudiant de Santiago Ramon y Cajal, del Rio-Hortega, a décrit la morphologie et les fonctions de toutes les cellules faisant partie du "troisième élément" et a élaboré ce terme.

De plus, il a utilisé le mot "microglie" pour décrire cette cellule qui diffère des neurones, des astrocytes et des oligodendrocytes qui eux sont formés à partir des progéniteurs neuronaux d'origine neuroectodermale (280, 281). En parallèle à la théorie de del Rio-Hortega, plusieurs équipes ont montré que les anticorps considérés spécifiques aux macrophages, tels que F4/80, étaient ainsi capables de marquer ces microglies. Toutes ces observations ont permis de suggérer que les microglies provenaient de la même origine mésodermale que les monocytes/macrophages (282, 283). Finalement, l'absence des microglies chez la souris déficiente du facteur de transcription PU.1, primordial pour la différenciation des cellules progénitrices myéloïdes en monocytes/macrophages, a confirmé l'origine commune des microglies avec ces cellules (284).

Il a été montré que des cellules morphologiquement similaires aux macrophages extravasaient vers le parenchyme cérébral à la seizième journée embryonnaire, avant l'hématopoïèse, et colonisaient tout le cerveau sous forme ramifiée. Chez l'Homme, les cellules avec une morphologie similaire à celles des microglies, que nous appelons « *microglia-like* », ont été détectées dès l'âge gestationnel de trois semaines. Ces cellules ont atteint le stade de maturation vers la trente-cinquième semaine (285). Contrairement à del Rio-Hortega qui pensait que c'étaient les cellules mononucléées qui se différenciaient en microglies, plusieurs études ont suggéré que les cellules progénitrices myéloïdes dérivées des cellules souches hématopoïétiques (CSH) ne contribuaient pas à la génération des microglies et que les microglies n'étaient générées que par des précurseurs embryonnaires

hématopoïétiques (281). Les progéniteurs érythromyéloïdes (PEM) $c\text{-Kit}^+$ (« *Receptor tyrosine kinase* ») / CD45^+ / CSF1R^+ (« *Colony-stimulating factor-1 receptor* ») / CX3CR1^- / F4/80^- sont générés par de l'endothélium hémogénique extraembryonnaire Tie2^+ (« *Angiopoietin-1 receptor* ») situé dans les îlots sanguins du sac vitellin. Ces derniers quittent le sac vitellin, colonisent le foie fœtal et se différencient en plusieurs types de macrophages immatures dont des macrophages vitellins et qui ensuite rentrent dans le neuroectoderme pour donner naissance aux microglies. Jusqu'à ces dernières années, il était généralement accepté que seulement les PEMs qui se rendent au neuroectoderme, étaient capables de donner naissance aux microglies (286). Cependant, des études récentes ont suggéré que CSHs exprimant l'*Hoxb8* (pour « *Homeobox B8* »), un facteur de transcription responsable de la différenciation des cellules progénitrices myéloïdes, peuvent également se différencier en microglies. Il a été montré que ces cellules amplifiées en grand nombre quittent le foie fœtal et infiltrent le cerveau à la J12.5 embryonnaire murine (287, 288). Tous ces résultats suggèrent que l'hypothèse sur les microglies dérivées des cellules hématopoïétiques infiltrant le SNC, émise par del Rio-Hortega pourrait expliquer l'origine d'une partie de la population microgliale (**Figure-14**).

La différenciation microgliale et la colonisation du SNC par ces cellules semblent être dépendantes du CSF1R et de ses ligands *Csf1* (aussi connue sous le nom M-CSF) et IL-34 (289-291). Les molécules inhibitrices de CSF1R récemment développées, telles que PLX3397, PLX5622, PLX647, ont permis de mieux étudier le rôle des microglies, en les déplaçant sans affecter le nombre de monocytes/macrophages (286). Leur développement nécessite la présence du $\text{TGF-}\beta$ (292). Dans un cerveau en homéostasie, une partie des microglies prolifèrent lorsque les autres subissent la mort cellulaire *via* l'apoptose. Différentes durées de vie, 96 jours à 29 mois, ont été rapportées. Leurs vies relativement longues montrent que les microglies sont des cellules résistantes. Il a été montré que 2% de la population microgliale, exprimant Ki-67, reste en prolifération en tout temps pour assurer un nombre de microglies fonctionnelles (293, 294).

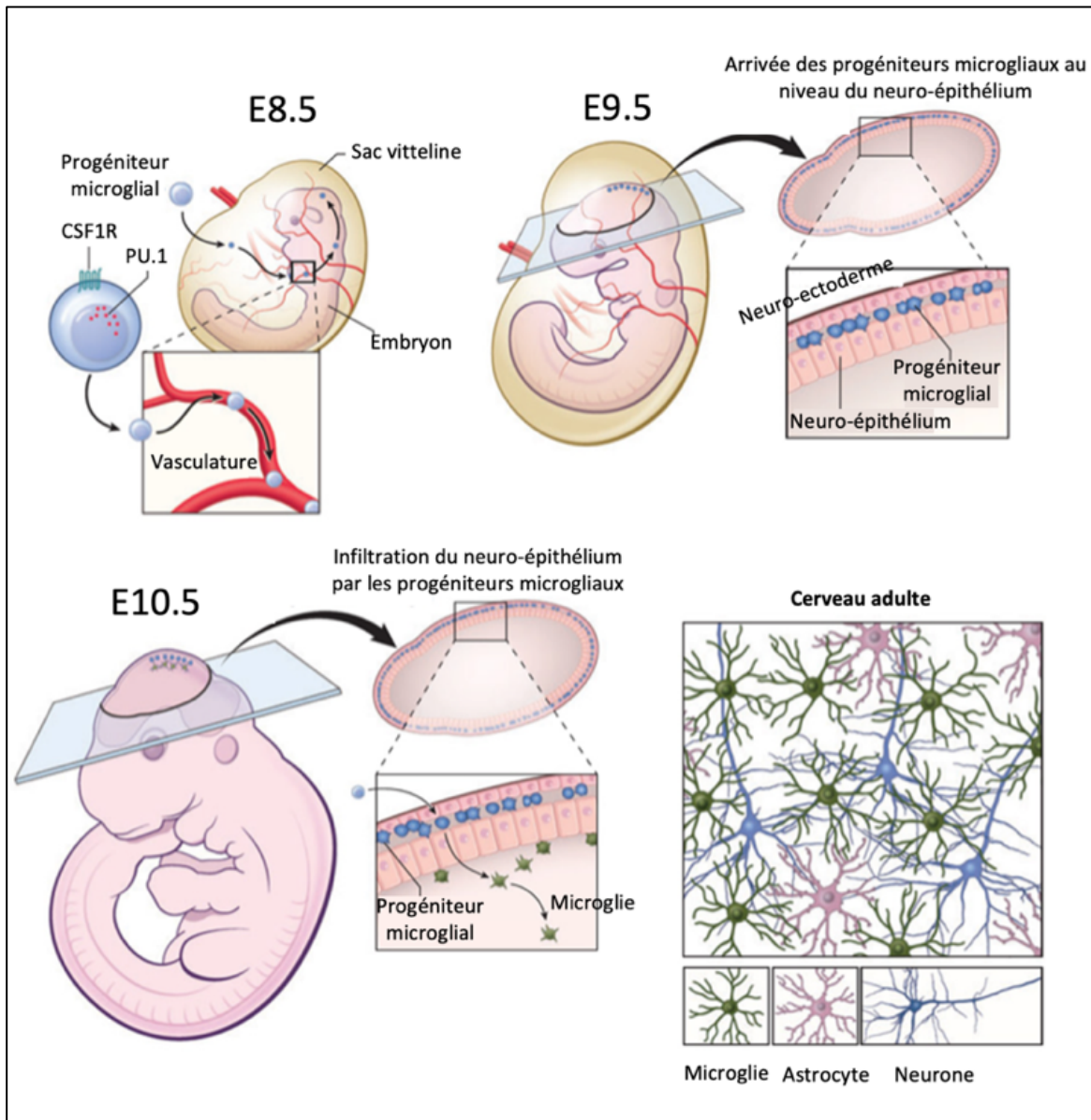


Figure-14 : Origine et développement de la microglie

Adapté de (295) : La microglie est ontologiquement distincte des monocytes/macrophages dérivés de la moelle osseuse, qui se trouvent dans les tissus périphériques. La microglie est dérivée de macrophages primitifs qui émanent du sac vitellin embryonnaire au cours du développement (avant le jour embryonnaire (E) 8.5, E8.5) et pénètrent le rudiment cérébral via le système circulatoire. Ces progéniteurs entourent le neuro-épithélium du cerveau en développement autour de E9.5. Au E10.5, ils pénètrent le neuro-épithélium et commencent à coloniser le parenchyme du SNC. La microglie au stade

précoce du développement a une morphologie amiboïde. Elle devient complètement ramifiée dans tout le cerveau au J28 postnatal. Le développement et la survie de la microglie dépendent de plusieurs facteurs, notamment du facteur de transcription PU.1 ainsi que de CSF1R.

4.2.4.2. L'hétérogénéité régionale de la population microgliale

Le SNC accueille une grande diversité de neurones et de glies. Ces cellules représentent une grande population hétérogène, avec des différences de morphologie, de nombre, de fonction, etc. L'étude de la signature transcriptomique de ces cellules à l'aide des techniques, comme le séquençage de l'ARN de cellule unique (scRNA-seq), a permis de révéler une multitude de sous-types cellulaires au sein d'une même famille cellulaire (296). Différents types de neurones dans plusieurs différentes régions continuent à être identifiés à l'aide de cette technologie (297, 298). Contrairement aux neurones, aux astrocytes et aux oligodendrocytes, les microglies n'étaient pas le centre de l'attention de ces études de caractérisation des différents sous-types cellulaires dans le SNC. Les études récentes montrant l'implication de ces cellules dans la majorité des maladies du SNC ont permis d'accélérer la recherche sur la découverte des différents phénotypes microgliaux situés dans différents domaines du SNC. Il a été montré qu'on peut même trouver des microglies ayant différentes fonctions dans la même région anatomique (293, 299).

Le nombre des glies varie en fonction de la région du SNC (72% du cortex cérébral vs 19% du cervelet est composé de glies). Cette différence souligne l'importance de la proportion de glies, dont les microglies, qu'on trouve dans différentes régions du SNC (300). Il a été montré que le cervelet et la ME contiennent moins de microglies que le cortex cérébral. En plus du nombre, ces microglies du cervelet présentent une morphologie différente avec moins de ramifications que celles dans d'autres régions (301). Les microglies du cervelet régénèrent moins rapides que celles se trouvant dans le cortex et expriment moins de CD68 et CMH-II (302, 303).

L'environnement physique et neurochimique, la perméabilité de la BHE, la présence de différents nombres de cellules et leur hétérogénéité, etc. peuvent avoir un impact sur le transcriptome microglial. Ces cellules ont différentes signatures transcriptomiques dépendamment de la région où elles se trouvent. Chez l'homme, les microglies du thalamus

expriment CD45, CD68, CX3CR1, CD11c, CD68, etc. de façon significativement plus élevée que ceux qui se trouvent dans le cervelet ou dans une autre région du SNC (304). Une étude a montré que les niveaux d'expression des gènes impliqués dans la réponse immunitaire tels que Clec4e (pour « *C-Type Lectin Domain Family 4 Member E* »), CD209a, Oas11 (pour « *2'-5'-oligoadenylate synthase-like protein 1* »), Ifitm3 (« *Interferon Induced Transmembrane Protein 3* »), H2-D1 (« *Histocompatibility 2, D region locus 1* »), etc. étaient plus élevés chez les microglies du cervelet et de l'hippocampe que ceux du cortex. Une des raisons potentielles de cette différence serait que la souris aurait besoin d'une microglie en alerte et plus immunogène qui serait capable d'éviter la réactivation des rétrovirus intégrant leur génome majoritairement dans le cervelet et l'hippocampe. Il faut savoir qu'environ 10 % du génome de la souris représente des séquences de rétrovirus résultant des anciennes infections. Ces rétrovirus ont réussi à coloniser la lignée germinale murine, et devenir un provirus survivant en tant qu'une séquence génomique suite à des pressions de sélection (305). D'après la même étude, plus les souris étaient âgées, moins la population microgliale était hétérogène. Ils ont constaté que les microglies du cervelet acquièrent un phénotype similaire à celui des microglies situées dans le striatum et le cortex, en augmentant l'expression des gènes impliqués dans les voies bioénergétiques, telles que Siglec5 (pour « *Sialic Acid Binding Ig Like Lectin 5* »), CD33 et CD172a (306). La perte d'hétérogénéité peut causer des pertes de fonction microgliale qui peut potentiellement accélérer les maladies neurodégénératives. De plus, ce phénomène d'hétérogénéité mène aux différentes réponses immunitaires dans différentes régions du SNC, qui peut également rendre une région plus ou moins vulnérable aux infections.

4.2.4.3. L'effet du sexe sur la microglie

Un chromosome X de plus avec plus de gènes impliqués dans l'immunité, des différences épigénétiques et hormonales font que le sexe a un impact majeur sur la réponse immunitaire, dont celle des microglies (307). L'étude transcriptomique sur les microglies isolées des deux sexes a démontré que ces cellules ont des signatures transcriptomiques spécifiques dépendantes du sexe, et qu'elles gardent la signature-sexe-spécifique même dans un cerveau du sexe opposé où elles sont transplantées (308).

Une des premières différences identifiées entre les deux sexes est le nombre de microglies, qui est plus élevé chez les souris mâles (309). À l'heure actuelle, il est connu que le nombre microglial varie en fonction du sexe, surtout dans le cortex, l'amygdale, l'hippocampe, et la région préoptique (308). En plus de la densité microgliale, les fonctions de ces cellules varient aussi. La différence dans l'expression des gènes et l'exposition aux différentes hormones sexuées affectent le fonctionnement des microglies. L'expression élevée du CMH-I/II chez la microglie mâle suggère que ces cellules possèdent une capacité plus élevée de présentation d'antigènes que celles des femelles (309). Les microglies mâles migrent également plus vite au site de lésion (310). Toutefois, la microglie femelle a une activité phagocytaire plus importante, comparée à celle de la microglie mâle (311). Les microglies femelles expriment plus de gènes impliqués dans la réponse anti-inflammatoire, comme *Fxyd1* (pour « *FXVD Domain Containing Ion Transport Regulator 1* »), *Aqp1* (« *Aquaporin 1* ») et *Shank3* (« *SH3 And Multiple Ankyrin Repeat Domains 3* »). Au contraire, les microglies mâles expriment plus de gènes pro-inflammatoires, tels que *S100a9* (« *S100 calcium-binding protein A9* »), *CXCL2* et *NF-κB*. Ces résultats suggèrent que la réaction inflammatoire d'une microglie mâle peut rendre les mâles plus susceptibles à certaines maladies du SNC (308).

4.2.5. La fonction microgliale

4.2.5.1. La microglie en état physiologique

Les microglies ont des fonctions essentielles dans le SNC en homéostasie. Cet état d'homéostasie, aussi appelé « surveillant » est dépendant de la présence de $TGF-1\beta$. Le consortium Immunological Genome Project (ImmGen) a identifié *Siglech* (pour « *Sialic acid-binding immunoglobulin-type lectin* ») et *CX3CR1*, comme des marqueurs spécifiques aux microglies surveillantes (312). *Olfml3* (pour « *Olfactomedin-like protein 3* »), *Tmem119* (pour « *Transmembrane protein 119* »), et *Siglech* étaient rapportés comme des gènes exprimés spécifiquement par ces cellules (313). Une autre étude a trouvé que *Tmem119*, *Fcrls* (pour « *Fc receptor-like molecule* »), *P2ry12* (pour « *Chemoreceptor for adenosine diphosphate* »), *P2ry13*, *Gpr34* (pour « *G Protein-Coupled Receptor 34* »), *Gpr84*, et *IL-1α* étaient significativement surexprimés chez les microglies surveillantes (314, 315).

Pendant longtemps, le seul rôle attribué à ces cellules était la surveillance immunitaire en cas de danger. Des études d'imagerie intravitale chez la souris ont révélé que les microglies étaient mobiles dans le cerveau homéostatique et qu'elles changeaient de morphologie sans avoir besoin d'un stimulus externe (316). De plus, ces cellules augmentent leur motilité, simultanément à l'activité synaptique (317). Le traitement avec des agents bloquant la polymérisation d'actine comme la tranculine B a empêché le déplacement de ces cellules. Leurs prolongements sont riches en GTPases de la famille Rho, un des éléments clés de la régulation des fibres d'actine. La sous-expression du Rac, une des GTPases, inhibe aussi leur mouvement (316, 318).

Ces cellules restent toujours en contact avec les neurones *via* l'axe CX3CR1/CX3CL1 (fractalkine), essentiel pour la communication du neurone avec la microglie (319). La molécule du CX3CL1, exprimée par diverses cellules, se trouve sur les membranes des neurones. Elle se trouve aussi sous forme soluble à la suite de son clivage par MMP3, ADAM10 (pour « *ADAM Metallopeptidase Domain 10* »), ADAM17, etc. Comme CX3CL1, plusieurs autres molécules se lient au CX3CR1 sur les microglies, telles que CD42 et CD200, protègent l'environnement homéostatique du SNC en inhibant l'activation de ces cellules. La phosphorylation du domaine appelé « *Immunoreceptor tyrosine-based inhibitory motif* » (ITIM) de ce récepteur inhibe des voies de signalisation impliquées dans la réponse immunitaire. Une diminution de CX3CL1 a été observée en présence des microglies réactives. Plusieurs études ont rapporté des anomalies du remodelage synaptique et une diminution du nombre et de l'activité phagocytaire de la microglie en cas de la perturbation de l'axe CX3CR1/CX3CL1 au SNC (320). Les microglies sécrètent également plusieurs facteurs neurotrophiques. Une étude *in vivo* sur la souris déplétée en BDNF chez les microglies a montré que ce facteur, qui active la signalisation du TrkB (pour « *tropomyosin-related kinase receptor* »), est indispensable pour la plasticité structurale synaptique (321, 322).

Les microglies sont les principaux phagocytes du SNC. En homéostasie, ces cellules utilisent leur capacité de phagocytose afin d'assurer la plasticité cérébrale. L'identification des éléments pré- et post-synaptiques, retrouvés dans les lysosomes des microglies, à l'aide de la microscopie électronique a montré que ces cellules participaient au phénomène de

remodelage synaptique, aussi appelée « l'élagage synaptique » (en anglais « *synaptic pruning* ») (323). Il a été montré que les microglies utilisent les voies du complément pour éliminer les synapses *via* l'opsonisation. Les microglies expriment le CR3 (pour « *complement receptor 3* ») composé de deux chaînes d'intégrine : CD11b (*itgax*) et CD18 (*itgb2*). Les microglies engloutissent et opsonisent les éléments présynaptiques induits par le C3b, un sous-produit du clivage de C3, *via* le récepteur CR3 (324). La perturbation de la signalisation C3/CR3 a également causé des problèmes de connexion neuronale lors du remodelage des synapses rétino-géniculées chez la souris (325). Durant le développement du cerveau dans la phase embryonnaire, les cellules précurseurs neurales prolifèrent excessivement et se différencient en neurones post-mitotiques. Les neurones post-mitotiques non fonctionnels activent l'apoptose, mort cellulaire programmée, pour se faire éliminer, afin de raffiner les réseaux neuronaux du cerveau en cours de développement. Il a été montré que la C1q, molécule clé du système du complément, joue un rôle majeur dans la phagocytose des neurones apoptotiques (326, 327).

La fonction de phagocytose des microglies est impliquée dans le contrôle de la myélinisation des axones. Les oligodendrocytes myélinisent les axones et contrôlent la vitesse de l'influx nerveux. Une grande majorité de la myéline autour des neurites, prolongements du corps cellulaire d'un neurone, est éliminée durant le développement du SNC. Cependant, les mécanismes n'étaient pas bien connus jusqu'à ce qu'une étude montre que les microglies participent au remodelage de la myéline, en la phagocytant sans que cela ait un impact sur les oligodendrocytes. L'augmentation significative du nombre des axones myélinisés en l'absence microgliale a confirmé leur hypothèse (328).

Un des éléments majeurs qui induit l'activation et la migration des microglies d'un site à un autre est l'ATP extracellulaire. Les astrocytes produisent et secrètent de l'ATP après avoir métabolisé le glutamate que les neurones libèrent dans la fente synaptique (329). Plusieurs études ont montré l'importance des voies de signalisation purinergique en étant responsables de la régulation des mouvements de base des microglies (319). Le traitement des tissus cérébraux avec l'apyrase, l'enzyme capable de dégrader l'ATP/ADP (pour « *Adénosine diphosphate* »), a causé une perte de motilité chez les microglies (330). Contrairement à ce dernier, la déplétion *in vivo* du P2RY12 a montré que ce récepteur n'a aucun impact sur la

surveillance basale microgliale, mais qu'un autre récepteur purinergique pourrait être impliqué dans la régulation des mouvements de la microglie en état basal (331). Une autre étude a rapporté le raccourcissement des prolongements microgliaux de l'hippocampe, en l'absence de CD39 qui est une ectonucléotidase métabolisant les nucléotides (332).

En plus des nucléotides extracellulaires, le glutamate a été suggéré comme un des éléments capables d'altérer l'état d'activation microgliale. Les astrocytes récupèrent le glutamate sécrété par les neurones afin d'éviter l'excitotoxicité. Il a été spéculé qu'en plus des astrocytes, les microglies peuvent aussi participer à la clairance du glutamate sécrété par les neurones. Les microglies situées dans la région CA1 de l'hippocampe allongent leurs prolongements suite à leur activation par le glutamate (333).

Tous les neurones du cerveau ne fonctionnent pas simultanément pour la même tâche, ce qui fait que le besoin énergétique de chacune des régions cérébrales n'est pas le même pour à un temps précis. L'apport des différentes quantités de glucose et d'oxygène dans différentes régions du cerveau est régulé par UNV. Cette dernière est capable de se dilater (vasodilatation) ou se contracter (vasoconstriction) suite à la détection du changement de l'activité neuronale à l'aide des astrocytes qui secrètent des médiateurs altérant la contraction des cellules musculaires lisses. Plusieurs études menées sur les neurones, astrocytes et péricytes ont montré que le dysfonctionnement de ces cellules durant les pathologies neurodégénératives conduit à une UNV non fonctionnelle ce qui cause des problèmes de flux sanguin. Cependant, l'impact de la microglie ayant moins de contact avec la vasculature a été longtemps négligé. Une étude récente *in vivo* a pu montrer que, contrairement à ce qui était pensé, les microglies établissent un contact dynamique avec des cellules endothéliales et musculaires aux différents niveaux de la vascularité cérébrale *via* P2Y₁₂R, suite au relargage d'ADP par les cellules formant l'UNV. Ils ont montré qu'en l'absence de microglie, la dilatation vasculaire nécessaire pour équilibrer le niveau sanguin était moins importante dans le cerveau en hypercapnie. En plus de la vascularité, les microglies forment une barrière physique protectrice autour du SNC. Similaires aux astrocytes, les microglies font partie de la membrane limitante gliale, qui se trouve entre le cortex et la pie-mère (334, 335).

4.2.5.2. *La microglie au cours d'une infection virale*

Les infections virales du SNC sont trois fois plus fréquentes que celles des bactéries, avec une incidence de 20 à 30/100 000 cas/an. Bien que ces infections soient majoritairement bénignes, elles peuvent toutefois causer de la mortalité et altérer la fonction normale du SNC à long terme. Malgré les barrières multicouches, plusieurs familles de virus, telles que les rétrovirus, le VIH, les entérovirus, les arbovirus, les poliovirus et les herpèsvirus arrivent à pénétrer le SNC (336, 337). Les virus peuvent infecter le SNC, en utilisant les nerfs du SNP, ou bien en perturbant la BHE. Le VVZ infecte les neurones pseudo-unipolaires du SNP, qu'il utilise pour être transporté vers la ME *via* le transport axonal antérograde. Le poliovirus situé dans la moelle épinière, se fait transporter par les motoneurones jusqu'aux plaques motrices. À la suite de sa libération dans la fente synaptique, le poliovirus infecte le muscle. Le VHS-1 infecte des neurones sensoriels de l'épithélium olfactif nasal et par la suite est transporté vers le cerveau *via* le transport antérograde. Les virus comme WNV ou le virus de l'hépatite C (VHC) infectent directement les cellules endothéliales de la BHE et envahissent le cerveau *via* la barrière compromise. D'autres, comme le VIH-1, peuvent même exploiter les monocytes, comme un cheval de Troie, afin d'infiltrer le SNC (336, 338).

À la suite de la détection des PAMPs par les PRR, les microglies répondent à l'infection en produisant des cytokines/chimiokines comme IL-1 β , IL-6, IFN- β , IFN- γ , TNF- α , CCL2, CCL5, etc. (339-341). En plus de la production de ces dernières, les microglies sont mobiles et migrent vers les sites d'infection en phagocytant les cellules infectées (273, 342). Le relargage d'ATP par les cellules infectées du SNC sert à recruter les microglies au site d'infection. L'expression de P2RY12 semble être cruciale dans le recrutement de microglies impliquées dans la clairance virale, en phagocytant des cellules infectées avec le PRV (343). En plus de son implication dans le recrutement, P2RY12 active la production d'IL-1 β *via* la formation de l'inflammasome et NF- κ B, qui est impliqué dans la réponse antivirale (344). L'expression de P2RY12 diminue suite à la stimulation du TLR-3 microglial, contrairement à celle de P2RY13. Cela permet d'émettre l'hypothèse que P2RY13 régule la réponse inflammatoire microgliale, et que P2RY12 est plutôt impliqué dans le recrutement des microglies dans la phase précoce de l'infection (345) (**Figure-15**).

Bien que les microglies soient moins susceptibles aux infections, certains virus comme WNV, JEV, VIH et ZIKV peuvent les infecter (346). Les virus utilisent différents récepteurs incluant ceux purinergiques, afin de s'attacher aux microglies et les infecter. Dans le cas du VIH-1, il a été montré que l'inhibition pharmacologique de P2X1 inhibe l'infection des macrophages, ce qui suggère qu'il est également possible que ce récepteur soit impliqué dans l'infection microgliale (347). Le VIH-1 utilise ainsi le CD4 et des corécepteurs, tels que CCR3, CCR5 et CXCR4, exprimés par la microglie, afin de l'infecter (337, 348-350). L'infection microgliale peut ainsi activer des mécanismes impliqués dans la mort cellulaire (351). Cependant, tous les virus ne causent pas la mort des microglies, ce qui est le cas pour le HCMV (352). Une fois à l'intérieur, le virus libère son génome, qui est détecté par différentes molécules, telles que MDA5, RIG-I ou cGAS-STING, permettent aux cellules d'initier la réponse inflammatoire (353). Par exemple, les microglies durant l'infection avec WNV produisent des quantités importantes d'IL-6, TNF- α , CXCL10, CCL2, etc., *via* l'activation de la voie de signalisation dépendante de MAPK (354).

La réponse inflammatoire microgliale dans les infections virales peut entraîner la neurotoxicité. La voie de signalisation du TNF- α chez la microglie mène au relargage du glutamate, qui cause la mort des neurones dans un modèle d'encéphalite au JEV (355). Les approches de déplétion des microglies à l'aide d'un traitement pharmacologique inhibant les récepteurs essentiels à leur survie, ou bien à l'aide de souris transgéniques, ont permis d'évaluer l'impact des microglies dans le contexte d'une infection virale. Par exemple, la souris déplétée d'IL-34 a démontré une plus grande susceptibilité à l'infection d'une souche de WNV atténuée (290). La déplétion des microglies chez une souris atteinte d'une encéphalite au MHV, a démontré leur importance dans l'élimination des débris de myéline, ainsi que dans la réparation de la gaine de myéline (356). L'absence microgliale peut parfois ne pas avoir d'effet sur la survie ni la charge virale, ce qui a été observé chez la souris K18-hACE2 infectée par le SRAS-CoV-2 (pour « *Severe acute respiratory syndrome coronavirus 2* ») (357). Contrairement à ces dernières, il existe des études rapportant des effets néfastes des microglies, sur le long terme. Différentes souris transgéniques déplétées d'IL-34 ou de molécules de cascade de complément telles, que C3 et C3ar1 avaient moins de perte synaptique due à l'infection au WNV (358). Les microglies semblent accélérer l'apoptose

neuronale suite à leur activation *via* les cytokines produites par les LT, telles que l'IFN- γ (346, 359).

Les microglies ont besoin de l'aide des autres cellules immunitaires pour combattre les infections du SNC. Elles utilisent les chimiokines afin de les recruter de la périphérie.

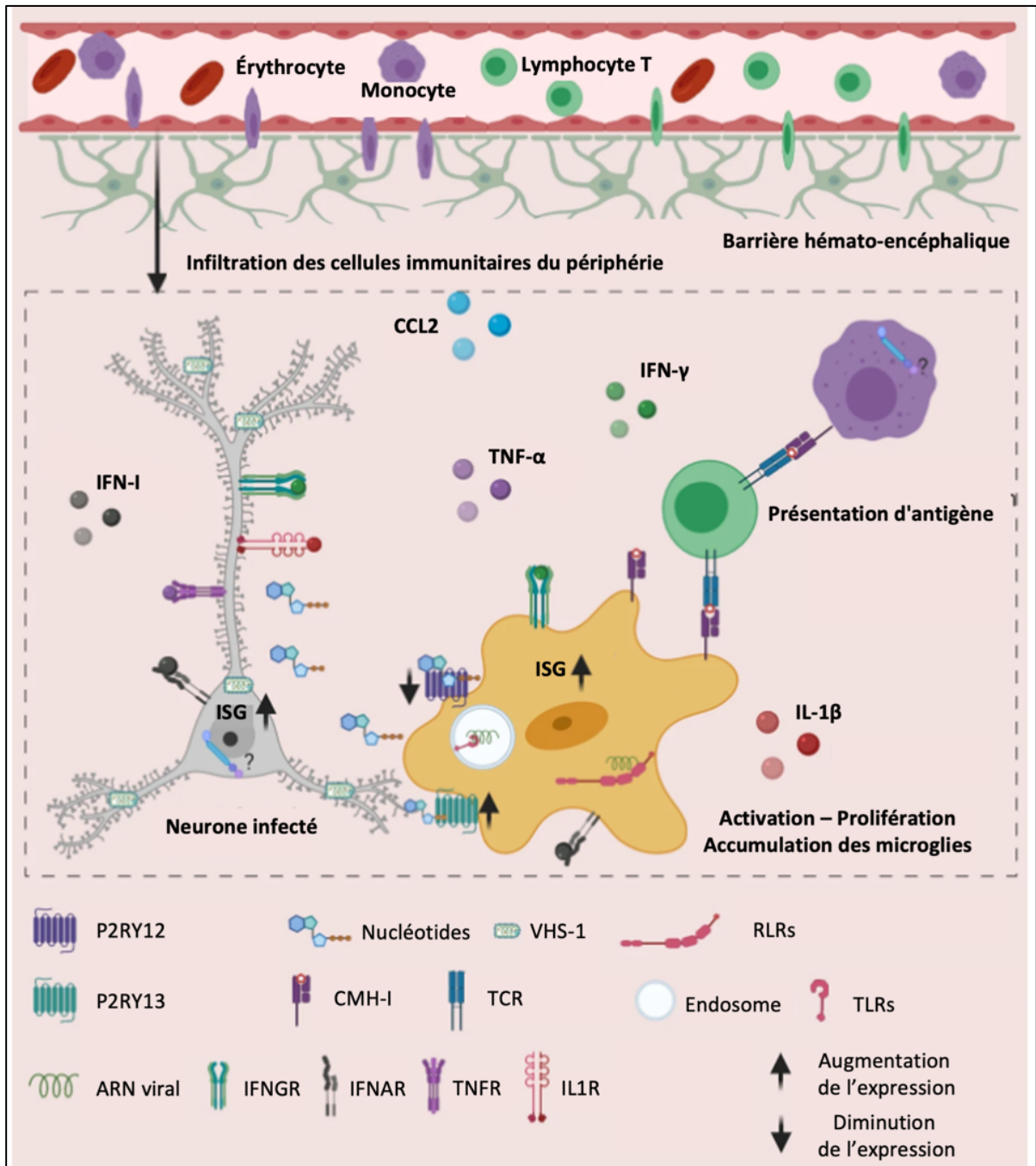


Figure-15 : L'implication de la microglie suite à l'infection virale du SNC.

Adapté de (346): La microglie participe à l'orchestration des réponses innées et adaptatives pour protéger l'hôte. Les cellules endommagées du SNC sécrètent des nucléotides que la microglie détecte via les récepteurs purinergiques, induisant ultérieurement leur migration vers les cellules endommagées. La détection des DAMPs conduit à l'activation microgliale, ce qui améliore la capacité de ces microglies à détecter les PAMPs viraux. Les microglies réactives produisent des cytokines/chimiokines impliquées dans le recrutement des cellules immunitaires de la périphérie. L'interaction avec les cellules infectées permet à la microglie d'activer plusieurs mécanismes antiviraux et aussi d'acquérir des antigènes pour les présenter aux LTs infiltrants. La présentation d'antigène par la microglie est essentielle pour les réponses des LT dans le SNC et la protection de l'hôte.

Les LT sécrétant IFN- γ , nécessaire pour inhiber l'infection au HCMV, sont recrutés à l'aide de CXCL10 produit par les microglies humaines (360, 361). De plus, l'interaction des microglies CD40⁺ CD86⁺ exprimant CMH-I/II, avec les LT infiltrants, reste primordiale pour l'activation des LT CD4⁺ et CD8⁺ (346, 362). Il a été montré que la déplétion microgliale augmente le nombre de LT infiltrants, mais diminue la production d'IFN- γ par les LT CD4⁺ au cours de l'infection par le MHV (363). Dans un modèle d'encéphalite au VSV, il a été montré que les microglies internalisent les antigènes des neurones infectés et les présentent aux LTs CD8⁺ afin d'induire la réponse antivirale (362).

4.2.5.2.1. La microglie au cours des infections aux VHS et de l'EH

Dans les années 90, l'intérêt croissant pour les microglies, les cellules immunitaires résidentes du SNC, a également influencé le domaine de l'EH et a positionné cette cellule au centre d'attention de la recherche sur la réponse immunitaire au cours de l'EH. De nos jours, il existe plusieurs centaines d'études autour de ce thème.

La détection des protéines virales du VHS-1 chez la microglie, comme l'ICP4, suggère que ces cellules sont infectées dans les conditions *in vitro*. Toutefois, les microglies sont considérées non permissives à l'infection par le VHS-1. À la suite de son infection *in vitro*, cette cellule génère un nombre limité de virions, qui par la suite deviennent indétectables (364, 365). Il a été suggéré que l'internalisation accrue du glutamate que les cellules du SNC libèrent par les microglies exprimant GLT-1 (pour « *Glutamate transporter 1* »), activent la synthèse du glutathion, qui potentiellement permet à ces cellules de devenir

non permissives, autrement dit résistantes à l'infection au VHS-1 (366). Malgré plusieurs études montrant la co-localisation *in vivo* de ce virus avec les microglies, il n'est toujours pas clair si les microglies sont infectées, ou bien phagocytent les autres cellules infectées du SNC.

Le TLR-2 extracellulaire, agissant en synergie avec le TLR-9, semble être responsable d'assurer le premier contact des microglies avec les protéines de la capsid de VHS-1 (367). Les microglies humaines produisent TNF- α , IL-1 β , CCL5 et CXCL10 lorsqu'elles sont infectées par le VHS-1. Les microglies déficientes en TLR-2, isolées de souris TLR-2^{-/-}, ne sont pas capables de sécréter les cytokines/chimokines incluant TNF- α , IL-6, IL-12, CCL2, CXCL9, et CXCL10, au cours de l'infection *in vitro* avec VHS-1 (365, 368). Une fois le VHS-1 se trouvant à l'intérieur de la cellule, ses composants sont détectés par d'autres PRRs. La détection des ARNdb viraux par le TLR-3, situé dans l'endosome, est cruciale pour la production des IFN-I (214, 247). La production d'IFN- β TRIF-dépendante par la microglie évoque la possibilité d'une activation microgliale *via* TLR-3 dans l'EH (369). Une étude récente a démontré que les astrocytes surexpriment TLR-3 suite à leur exposition aux IFN-I produites par les microglies (229). Cependant, le rôle exact de TLR-3 dans la réponse microgliale dans l'EH n'est toujours pas connu.

L'exposition des cellules au VHS-1 stimule la production d'IFN et aussi les ISGs, majoritairement *via* l'activation d'IRF-3 (370). La microglie détectant l'ADN viral à l'aide de cGAS semble produire des IFNs, dans le modèle murin d'EH (229). Au contraire, Lokensgard et ses collègues ont démontré que les microglies humaines infectées avec le VHS-1 *in vitro* n'ont pas augmenté la production d'IFN- α ou d'IFN- β (365). De plus, la déplétion de cGAS stimulant la production d'IFN- β *via* IRF-3 n'a pas altéré la réponse antivirale des microglies humaines (371). Une étude récente chez la souris et les tissus humains post-mortem a révélé que la production d'IFNs est assurée uniquement par les microglies situées dans les régions modérément infectées du SNC, *via* la voie cGAS–STING. Les microglies situées au cœur des foyers infectieux, qui ne sont plus capables de produire assez d'IFNs, activent l'apoptose à l'aide de cGas. D'après la même étude, le choix de la voie à activer par ce senseur d'ADN dépend de la concentration virale (372). Le rôle des autres senseurs d'ADN exprimés par les microglies, comme le RIG-I, MDA5 et l'IFI16, reste à étudier dans le contexte de l'EH.

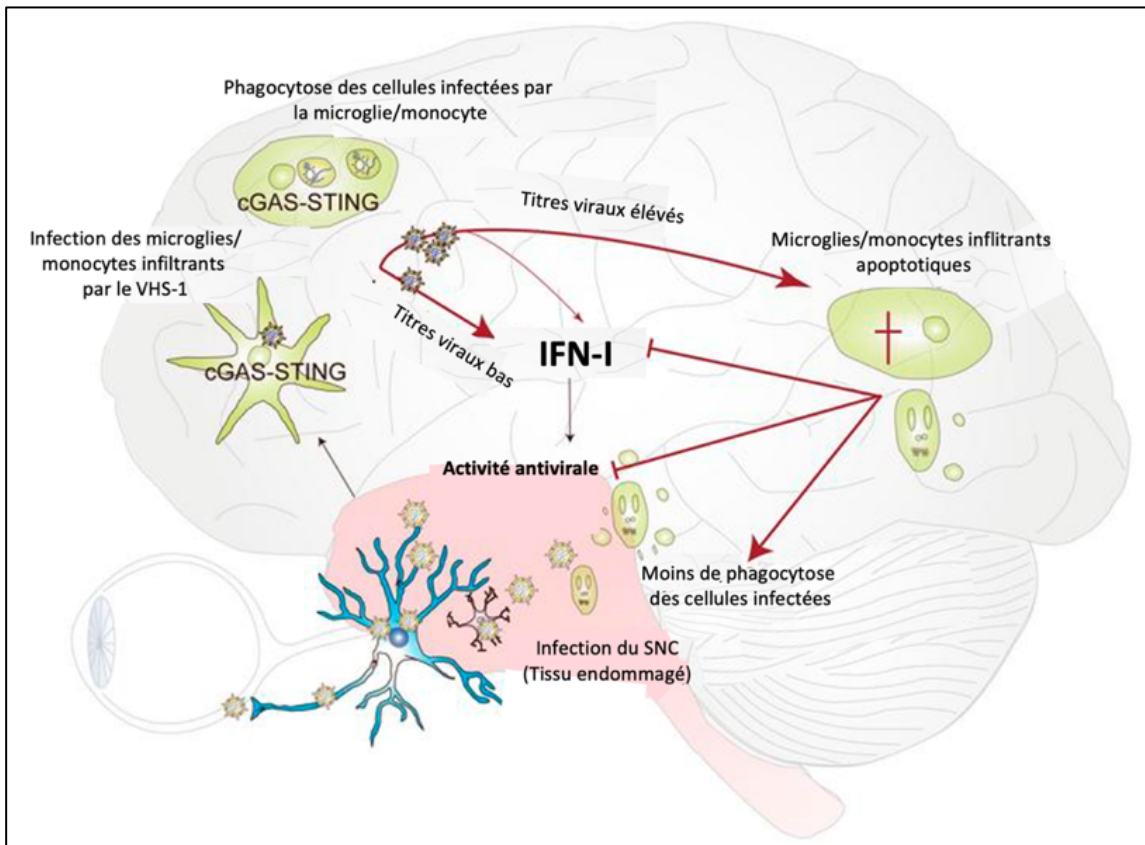


Figure-16 : Le cGAS déclenche la réponse antivirale induite par l'IFN-I, mais est également impliqué dans l'activation de l'apoptose chez les cellules immunitaires infiltrantes.

Adapté de (372) : Le modèle illustre comment la microglie détecte le VHS-1, soit lors de son infection, soit lors de la phagocytose des cellules infectées par le virus. Lorsque la charge virale locale est faible, la microglie exprime principalement l'IFN-I, qui a une activité antivirale. Cependant, lorsque la charge virale est relativement élevée, la signalisation cGAS/STING change pour favoriser l'apoptose en induisant l'expression de l'ARNm de Puma, la libération de cytochrome c par les mitochondries et le clivage de la caspase-3. Cela réduit la réponse IFN-I et limite potentiellement l'immunopathologie.

L'IL-6 produit spécifiquement par les microglies inhibe la différenciation des cellules souches nerveuses et augmente leur survie *via* l'activation de STAT3, sans avoir d'effet sur la réplication virale (373). La microglie a été aussi identifiée comme la principale source d'IL-1 β au cours de l'EH chez la souris (374). Les inflammasomes, surtout ceux qui sont

dépendants d'ASC, permettent aux microglies de produire l'IL-1 β et IL-18 au cours de l'infection. La déplétion d'ASC, une molécule adaptatrice liant les structures NALPs (pour « *NACHT, LRR and pyrin domains containing protease* ») et les domaines PYD et CARD de pro-caspase-1, a perturbé la production de ces deux cytokines pro-inflammatoires et a amélioré la survie, ce qui souligne le rôle à double tranchant de la microglie dans l'EH (375). Le NO, majoritairement sécrété par les microglies, inhibe la réplication du VHS-1 chez les neurones, mais cause aussi un stress oxydatif (376). De plus, l'activation de la voie Fas/FasL chez ces cellules résistantes à l'apoptose induit la surproduction de NO, qui conduit à la mort neuronale (377).

L'infection des microglies avec le VHS-1 induit également la production de ROS de manière dépendant de TLR-2. La production intracellulaire de ROS dépend de l'activité de TRAF-3 et TRAF-6 S-glutathionylisées et active les voies de NF- κ B et IRF-3 (378). L'oxydase NADPH (pour « *nicotinamide adenine dinucleotide phosphate* ») induit la production de ROS activant les MAPKs, ce qui permet aux microglies murines infectées avec le VHS-1 de produire du TNF- α , IL-1 β , CCL2 et CXCL10 (379, 380). Les ROS semblent ainsi jouer un rôle dans la production des MMPs par les microglies. Le NF- κ B activé par les ROS produit par NADPH oxydase se lie au promoteur du gène de MMP-9 et régule la production de ce dernier. Il a été montré que la microglie représente la cellule productrice principale de MMP-9 dans l'EH et que la surproduction des MMPs dont MMP-9 provoque la rupture de la BHE détériorant le pronostic (369, 381, 382).

Les chimiokines produites par la microglie servent à coordonner l'infiltration des cellules immunitaires dans le SNC à partir de la périphérie au cours de l'EH. La microglie réactive produit CXCL10 et CCL2, responsables du recrutement des cellules immunitaires (383). Les microglies, ainsi que les astrocytes, produisent CCL6 à l'aide de l'activité des inflammasomes, qui recrutent les macrophages au SNC (375). Tel que mentionné précédemment, l'infiltration des neutrophiles est régulée par le CXCL1 des astrocytes périvasculaires activés par l'IL-1 α produite par les microglies au cours de l'EH (279). Menasria et ses collègues ont montré que l'absence du récepteur CX3CR1 au SNC au cours de l'EH mène à une augmentation de la production de plusieurs médiateurs comme IL-1 β , IL-6, IFN- γ , CCL2 et CCL5 et cause ainsi une infiltration de neutrophiles Ly6G⁺

(« *Lymphocyte antigen 6 complex locus G6D* ») et de monocytes inflammatoires Ly6C^{high} (« *lymphocyte antigen 6 complex, locus C1* ») plus importante (384, 385). Une autre étude a démontré que la déplétion des microglies par PLX5622 a inhibé complètement l'infiltration monocyttaire durant l'EH au PRV (343). Contrairement à ces derniers, Tsai et ses collègues ont suggéré que la déplétion microgliale provoque l'augmentation de l'infiltration de neutrophiles et de LTs CD4⁺ et CD8⁺ durant l'EH (386).

Un des principaux mécanismes que la microglie utilise pour la clairance virale du SNC est la phagocytose. Au cours de l'EH, la microglie augmente l'expression de CD68, une glycoprotéine transmembranaire de la famille LAMP (pour « *lysosomal/endosomal-associated membrane glycoprotéines* »), ce qui montre son activité phagocytaire élevée (386). L'interaction physique de la microglie CD68⁺ avec les cellules infectées au PRV a été mise en évidence à l'aide de plusieurs techniques de microscopie. Cela a renforcé l'hypothèse sur l'importance de la phagocytose dans le contrôle de l'EH (343). En se basant sur l'expression accrue de CHM-II par la microglie, il a été suggéré qu'elle phagocyte les cellules infectées et ensuite fait la présentation d'antigène *via* le CHM-II, afin d'activer les LTs CD4⁺ (364, 387). Cependant, plusieurs études ont rapporté que la microglie utilise plutôt le CHM-I pour induire la réponse lymphocytaire cytotoxique CD8⁺ spécifique au VHS-1, nécessaire pour contrôler l'EH (374, 388, 389). En effet, la diminution de l'expression de H-2Kb par la microglie peut inhiber l'activation des LT CD8⁺ (388).

Dans la phase précoce des infections, l'apoptose des cellules infectées permet de limiter la réplication virale, en réduisant le nombre de cellules infectées produisant des virions (390). Les microglies infectées au VHS-1 *in vitro* activent les voies de la mort cellulaire, comme l'apoptose et la nécrose. Le TLR-2 joue un rôle dans l'activation de l'apoptose de ces cellules. La TNF- α produite par les microglies infectées peut également induire la surexpression des gènes de la signalisation TNF, qui les conduit vers l'apoptose (391, 392). Il a été rapporté que les microglies situées dans les régions hautement infectées du cerveau deviennent apoptotiques, à la suite de l'activation de la voie cGAS/STING (372) (**Figure-16**). Toutefois, la microglie réactive semble devenir résistante à l'apoptose et perdure dans le SNC, ce qui peut ainsi mener à la neuroinflammation. Il a été montré que les concentrations faibles de NO, permettant d'inhiber la réplication du VHS-1 chez les

neurones, rendent les microglies résistantes à l'apoptose, en bloquant les caspases. Une autre étude a rapporté que les microglies infectées au VHS-1 sont également résistantes à l'induction de l'apoptose par la voie Fas/FasL (377, 393).

Plusieurs études suggèrent que la réponse inflammatoire menée par la microglie a un effet bénéfique dans la phase précoce de l'EH. Toutefois, certaines molécules médiatrices produites par ces cellules semblent aggraver la maladie, ce qui souligne leur nature à double tranchant de la réponse immunitaire. D'autres études sont nécessaires afin de mieux disséquer le comportement complexe de ces cellules dans l'EH et de trouver les moyens permettant de moduler leur réponse inflammatoire durant cette infection.

5. La réponse immunitaire des cellules infiltrantes

5.1. Les cellules myéloïdes

Les chimiokines sécrétées par les microglies se retrouvent dans le sang, ce qui initie le recrutement des cellules immunitaires de la périphérie au cours de l'EH (394). À l'heure actuelle, il est assumé que le recrutement des cellules immunitaires au niveau du cerveau, nécessaire pour le contrôle de l'EH, se fait de manière sélective à l'aide de la BHE (**Figure-17**). L'absence de fuite d'albumine a suggéré que la BHE reste intacte au cours de l'EH dans le modèle murin C57BL/6 infecté par voie intranasale (395). Cependant, une surproduction de médiateurs inflammatoires peut engendrer l'infiltration excessive du SNC par les cellules immunitaires de la périphérie participant à une réponse inflammatoire exacerbée menant à la neurotoxicité. En accord avec cette hypothèse, une amélioration de la survie d'une lignée de souris sensible à l'EH a été observée lors de la déplétion des macrophages et neutrophiles infiltrants. De plus, l'utilisation des corticostéroïdes inhibant NF- κ B dans la phase tardive de l'EH améliore la survie, tout en calmant la réponse inflammatoire sans affecter la charge virale cérébrale (160, 396).

5.1.1. Les neutrophiles

Les neutrophiles, un des quatre types de granulocytes représentant 40 à 60% de tous les leucocytes, sont des cellules phagocytaires, capables de produire des protéines antimicrobiennes en plus des cytokines/chimiokines. Les HPN (pour « *Hepsin* »)-1, 2 et 3 appartenant à la famille des défensines sécrétées par les neutrophiles, semblent se lier et

neutraliser le VHS-1 (397). Les neutrophiles utilisent également un mécanisme spécial appelé la « *Neutrophil Extracellular Trap* » (NETose), leur permettant d'éjecter leurs contenus nucléaires et granulaires formant un réseau fibrillaire qui bloque et lyse les pathogènes et/ou les cellules infectées (398). Les neutrophiles sont les premières cellules infiltrantes au cours de l'EH chez la souris. Chez l'Homme, ces cellules sont observées dans le parenchyme cérébral dès le deuxième jour de l'infection au VHS-1 (135, 395). La souris CCR5^{-/-} a moins de neutrophiles au niveau de la cornée infectée par VHS-1, suggérant que l'axe CCL5/CCR5 joue un rôle crucial dans le recrutement de ces cellules au niveau du SNC. Toutefois, une diminution de la charge virale a été observée chez ces souris. D'après une étude récente, l'axe CXCL1-CXCR2 contrôle l'infiltration des neutrophiles au cours de l'EH (279, 399, 400). L'IL-4 apparaît aussi dans la liste des médiateurs responsables du recrutement de ces cellules (401). De plus, leur infiltration devient plus importante en absence des microglies ou de leur récepteur CX3CR1 au SNC (385, 386).

Les neutrophiles infiltrants produisent des molécules antivirales, telles que TNF- α et NO dans un modèle murin de kératite herpétique. La déplétion de ces cellules à l'aide d'anticorps monoclonaux, tels RB6-8C5 a causé des encéphalites plus sévères chez la souris. Une autre étude a rapporté que les neutrophiles sont nécessaires pour une meilleure clairance virale, mais que la sécrétion d'IL-12 par ces cellules induit la réponse Th1 pro-inflammatoire qui détériore la maladie (402-404). En plus des microglies, les macrophages et les neutrophiles infiltrants produisent des ROS et contribuent au stress oxydatif retrouvé dans l'EH (405). L'inhibition de l'axe CXCL1-CXCR2 a diminué le nombre de neutrophiles infiltrants et a restauré la BHE, ce qui a éventuellement mené à la mortalité réduite dans l'EH, sans affecter les titres viraux dans le SNC. Durant la résolution de l'inflammation, les neutrophiles deviennent apoptotiques et se font phagocyter par les macrophages infiltrants (406). Dernièrement, plusieurs autres hypothèses, telles que la phagocytose des neutrophiles par les microglies ou bien leur retour dans la circulation sanguine suite à leur infiltration, ont été émises par les chercheurs (407, 408). Le VHS-1 semble induire la sécrétion de FasL chez les neutrophiles humains infectés, ce qui a été rapporté comme un mécanisme d'évasion immunitaire inhibant la réponse antivirale (409). À l'opposé, il a été suggéré que l'apoptose de ces cellules les empêche de perdurer dans le cerveau infecté au VHS-1 et d'aggraver l'inflammation. La même étude a démontré que la production d'IFN- γ par les LT est

nécessaire pour induire une diminution de la production de G-CSF (pour « *Granulocyte colony stimulating factor* ») et IL-6, rendant les neutrophiles Ly6G⁺ résistants à l'apoptose (410).

5.1.2. Les monocytes/macrophages

Les CSH génèrent en continu les précurseurs communs myéloïdes qui donnent naissance aux différents types de monocytes dont les monocytes inflammatoires Ly6C^{high} et patrouilleurs Ly6C^{low} chez la souris, équivalents des monocytes CD14⁺ (incluant les monocytes classiques (CD14⁺CD16⁻), les monocytes intermédiaires (CD14⁺CD16⁺)) et les monocytes non-classiques (CD14^{intermédiaire}CD16⁺) chez l'Homme. Les monocytes inflammatoires peuvent ainsi se différencier en monocytes patrouilleurs à l'aide de facteurs de transcription comme Nur77. Ces cellules phagocytaires infiltrent les tissus et se différencient en macrophages ou bien en cellules dendritiques dérivées de monocyte (mCD) en condition inflammatoire, ce qui explique la raison de les étudier comme une seule entité, les monocytes/macrophages. La différenciation des monocytes infiltrants en macrophage ou bien en CD dépend des différents médiateurs solubles auxquels ils sont exposés dans différents tissus (411). Les monocytes infiltrants le SNC peuvent même acquérir un phénotype similaire à celui des microglies, en condition inflammatoire (412-414). Les macrophages sont majoritairement générés par les monocytes du foie fœtal durant la phase embryonnaire. Les monocytes circulants ne contribuent pas à la régénération des macrophages à l'état homéostatique. L'absence de chimérisme pour les macrophages et les mCDs retrouvés chez la souris parabiotique a soutenu l'idée de la contribution d'un auto-renouvellement plutôt qu'une différenciation monocyttaire contribuant au renouvellement de ces cellules (415).

Au début de leur infection *in vitro*, les monocytes produisent de faibles quantités de VHS-1, qui finissent par arrêter. On considère donc que les monocytes sont semi-permissifs au VHS-1. De plus, les IFNs produits par ces monocytes infectés semblent bloquer leur différenciation vers l'état de macrophage au cours de cette infection (416, 417). En plus de leur capacité de phagocytose, les monocytes produisent des cytokines/chimiokines, telles que TNF- α , IL-1 β , IL-6, etc. (418, 419). Il a été suggéré que l'activité cytolytique des NK, nécessaire pour une immunité anti-herpétique, a besoin d'IL-15, produite majoritairement

par les monocytes. L'infection de la lignée cellulaire monocyttaire humaine THP1 a révélé que la production d'IL-15 a été activée *via* la voie de signalisation TLR-2 incluant MyD88-IRAK1-TRAF6 et NF- κ B (420, 421). L'augmentation de la réplication virale suite au blocage de FasL exprimé par les monocytes infectés par VHS-1 a conduit à l'hypothèse de l'inhibition de la réplication virale à l'aide de l'apoptose, souvent acceptée comme un mécanisme d'évasion permettant aux virus d'induire la mort des cellules immunitaires au cours de l'EH (422).

Le recrutement des monocytes au SNC nécessite l'implication de l'axe CCL2/CCR2. Il a été montré que la déplétion de CCR2 diminue significativement le nombre de monocytes infiltrants et provoque une augmentation de la mortalité dans l'EH. En accord avec ce dernier point, l'absence de CCR2 chez les cellules hématopoïétiques induit une diminution du nombre de monocytes inflammatoires recrutés au SNC, ce qui conduit à l'augmentation des titres viraux et des cytokines pro-inflammatoires au cerveau (279, 384). Contrairement au CCR2, la déplétion de CX3CR1 chez les cellules hématopoïétiques n'a aucun impact sur l'infiltration des cellules immunitaires, dont les monocytes (385). De plus, il a été suggéré que l'IL-6 sécrété par les microglies joue un rôle dans le recrutement de ces monocytes dans le SNC au cours de l'EH (375).

Les monocytes infiltrants en contact avec le facteur de croissance Csf1 se différencient en macrophages. En fonction des autres cytokines/chimiokines accompagnant le Csf1, comme IFN- γ et IL-4, les macrophages acquièrent un phénotype pro-inflammatoire et anti-inflammatoire, respectivement (411). Similaire aux monocytes, l'activation des macrophages semble être indépendante de TLR-2 au cours de l'infection au VHS-1 (423). La production d'IFN- α/β semble être initiée par PKR codée par le *eif2ak2* plutôt que par les TLRs chez le macrophage infecté (424). Suite à l'effet autocrine d'IFN- α/β et de TNF, ces macrophages commencent à produire des ROS permettant d'inhiber l'infection au VHS-1. L'IL-12 produite par les macrophages active la production d'IFN- γ par les NKs, ce qui amplifie la production d'IFN- α/β et de ROS chez les macrophages (425). Cette production plus élevée d'IFN- α/β par les macrophages femelles a été suggérée comme un des éléments qui rend les souris femelles plus résistantes aux infections au VHS, que les souris mâles (426, 427).

Le VHS-1 est endocyté par le macrophage pour ensuite s'accumuler dans les corps multivésiculaires, qui sont un type d'endosome tardif contenant de petites vésicules intraluminales, autrement dit exosomes. Une étude récente a révélé que la sphingosine issue du clivage du céramide par la céramidase, se liant au VHS-1 dans les exosomes des macrophages, permet d'inhiber l'infection de ces derniers, en bloquant la fusion de la membrane endosomale avec le virus (428). En plus de contenir le VHS-1, les macrophages utilisent ces exosomes afin de délivrer les IFITs, servant à activer divers mécanismes antiviraux chez les cellules voisines (429, 430).

L'infection des souris chimériques ayant des cellules hématopoïétiques GFP⁺ a permis de montrer que les macrophages expriment le CD68 et le CMH-II, ce qui suggère une contribution potentielle de ces cellules à la présentation d'antigène (395). La déplétion des macrophages par le traitement liposome-clodronate des souris a causé la diminution des taux de survie pendant l'EH. Au contraire, une autre étude a suggéré que la déplétion des macrophages en même temps que des neutrophiles, améliore la survie sans altérer les titres de VHS-1 dans les cerveaux des souris (396, 431). De plus, la corrélation entre l'infiltration des macrophages et les lésions nécrotiques retrouvées dans le cerveau de l'Homme atteint d'EH, amène à se poser la question sur le rôle bénéfique des macrophages dans l'EH (135). D'après ces résultats contradictoires, d'autres études restent primordiales afin d'élaborer sur le rôle de ces cellules dans l'EH.

5.1.3. Les cellules dendritiques (CDs)

Les CDs sont les cellules présentatrices d'antigène professionnelles du système immunitaire. L'activité protéolytique réduite dans l'endosome des CDs permet de garder une configuration antigénique similaire à celle de l'état initial, ce qui rend les CDs des meilleures présentatrices d'antigènes que les monocytes. Ces cellules migrent dans les ganglions lymphatiques ou ils induisent la réponse lymphocytaire T spécifique *via* leur CMH-I couplé à l'antigène (432, 433). Le renouvellement de la population de CD tissulaires ayant une durée de vie courte est assuré par la moelle osseuse qui ne cesse de produire des progéniteurs de CDs. En état homéostatique, les progéniteurs des CDs se différencient en pré-CD ou en pré-CDp qui deviennent des CDc (CD conventionnelle) spécialisées en présentation d'antigènes ou des CDp (CD plasmacytoïde) productrices d'IFN spécialisées dans la réponse antivirale

(434). *In vitro*, les monocytes se transforment en CD8⁺ en présence de GM-CSF (pour « *Granulocyte-macrophage colony-stimulating factor* ») et IL-4. En condition inflammatoire *in vivo*, les monocytes infiltrants peuvent également se différencier en mCD8⁺ (411, 435).

Les CD8⁺ sont également indispensables pour une réponse immunitaire capable d'inhiber l'infection du VHS-1. Le traitement par le FL (pour « *Flt-3 ligand* ») de la souris infectée au VHS-1 a augmenté le nombre des CD8⁺ et a amélioré le contrôle de l'infection (436). Le TLR-2/9 semble être impliqué dans la différenciation des monocytes infiltrants en mCD8⁺, qui produisent des TNF- α et des iNOS au cours de l'infection au VHS-1 (437). D'abord, il a été suggéré que ces TLRs sont responsables de l'activation des CD8⁺ *via* la reconnaissance des glycoprotéines et de l'ADN du VHS-1. Cependant, l'activation des CD8⁺ même en absence de MyD88, impliqué dans la voie de signalisation de TLRs, a montré l'implication des autres PRR, tels que les senseurs cytosoliques d'ADN activant l'expression des gènes d'IFNs. Le DDX41 (pour « *DEAD-Box Helicase 41* ») a été cité comme un senseur d'ADN capable de se lier avec STING, qui initie la production d'IFN et la production des autres cytokines chez la CD8⁺ infectée par le VHS-1 (438-440). L'infection *in vitro* des CD8⁺ permissives au VHS-1, déclenche la production d'IL-6 et IL-12. Au contraire, une autre étude *in vitro* a rapporté que la production d'IL-12 a été inhibée, contrairement à celle d'IFN-I, par les CD8⁺ infectées par le VHS-1. La migration de ces cellules vers les ganglions est cruciale pour l'induction de la réponse lymphocytaire CD4⁺ et CD8⁺. La diminution d'expression du CCR7 observée chez les CD8⁺ infectées par le VHS-1 semble altérer le chimiotactisme pour le CCL19, impliqué dans leur migration vers les ganglions lymphatiques (438, 441). Il a été proposé que ce sont plutôt les CD8⁺ non-infectées phagocytant les débris libérés par les autres CD8⁺ infectées apoptotiques, qui quittent le site d'infection pour induire la réponse LT spécifique au VHS-1. De plus, les CD8⁺ migratoires ont besoin de transférer l'antigène aux CD8⁺ CD8⁺ des ganglions lymphatiques capables d'initier la réponse LT (442, 443). L'apoptose de ces CD8⁺ infectées nécessite la diminution de l'expression de c-FLIP (pour « *Cellular FLICE (FADD-like IL-1 β -converting enzyme)-inhibitory protein* »), un inhibiteur de l'apoptose dépendant de la caspase-8, mais aussi des niveaux d'expression faibles du transcrit LAT. En plus de l'apoptose, les CD8⁺ infectées activent les mécanismes d'autophagie de façon indépendante de la voie classique PKR/eIF2 α , pour limiter la réplication du VHS-1 (444, 445).

Les souris infectées par la voie intraoculaire ont montré que les CD^s apoptotiques activent les LT CD4⁺ producteurs de cytokines/chimiokines favorisant l'infiltration des neutrophiles qui exacerbe la réponse inflammatoire. L'inhibition de l'apoptose chez ces cellules semble améliorer la survie, sans aucun effet sur les titres viraux dans le cerveau (446). La réduction significative du virus latent dans les GT suite à la déplétion des CD^s, a suggéré que le VHS-1 peut s'en servir comme la cellule hôte assurant sa réactivation (447). D'un autre côté, les CD^s CD45⁺CD11c⁺CHM-II⁺⁺ représentent les principales productrices d'IL-1 β au cours de l'infection du NT par le VHS-1 chez la souris. L'augmentation de l'expression de H-2Kb par les cellules similaires à CD11b⁺CD11c⁺CD45⁺⁺ a souligné l'induction potentielle d'une réponse LT CD8⁺ par ces cellules dans l'EH (388, 448). Récemment, Canivet et ses collègues ont suggéré que l'infiltration tardive de CD^s et de NK/NKT peut être un facteur qui explique les titres viraux cérébraux plus élevés chez la souris sensible BALB/c comparativement à la souris résistante C57BL/6 (449).

5.2. Les cellules lymphoïdes

5.2.1. Les Natural killers (NKs)

Les NKs sont des cellules immunitaires lymphoïdes cytotoxiques capables d'induire la mort des cellules infectées, soit en exprimant FasL et TRAIL (« *TNF-related apoptosis-inducing ligand* »), ou en libérant des granules contenant des protéases comme la Granzyme B et la perforine (450). Dans la moelle osseuse, les CSH se différencient en progéniteurs lymphoïdes communs, qui deviennent des cellules pro-B, pré-B et des cellules lymphoïdes innées. Ces dernières donnent naissance aux NK immatures, qui finissent par devenir fonctionnels à la suite de leur différenciation finale dans les organes lymphoïdes secondaires. Les NKs représentent 5 à 20% des lymphocytes circulants chez l'Homme. (451, 452). La reconnaissance de CMH-I par le KIR (pour « *Killer cell immunoglobulin-like receptor* ») et Ly49, exprimés respectivement par les NKs de l'Homme et de la souris, inhibe l'activation de ces cellules contre la cellule du soi (453). En cas de contact du récepteur NKG2D chez l'Homme et Ly49H chez la souris avec l'antigène présenté par le CMH-I des cellules infectées, les NKs s'activent, commencent à proliférer et à sécréter plusieurs cytokines/chimiokines, telles que l'IFN- γ qui elle active les LT. Le CD16 (Fc γ RIII) reconnaissant l'anticorps neutralisant peut ainsi activer les NKs (451).

L'infection *in vitro* des NKs humains par le VHS-1 a suggéré que ces cellules sont permissives au VHS-1. Leur stimulation *in vitro* a relevé l'altération de leur fonctionnement, en montrant la réduction de leur activité de dégranulation. De plus, l'infection des NK affecte la production de cytokines/chimiokines, dont l'IFN- γ (454, 455). La lyse des fibroblastes infectés au VHS-1, suite à l'ajout des NKs dans la culture, a montré qu'elles exercent un effet cytotoxique limitant l'infection. Il a été suggéré que la diminution d'expression de protéines, telles que HLA-C (pour « *Major Histocompatibility Complex, Class I, C* ») détectée par KIR est responsable de l'activation des NKs au cours de l'infection par le VHS-1 (456). Une autre étude a confirmé que les NKs inhibent la réplication du VHS-1 et a aussi suggéré que leur effet anti-herpétique n'est pas dépendant que de la lyse (457, 458). Les NKs activées *via* les TLR-2/9 activent la voie de p38 MAPK (437). En plus de ces TLRs, les récepteurs naturels de la cytotoxicité (NCR), une série de protéines transmembranaires, comme NKp30, NKp44 et NKp46, capables de reconnaître le non-soi, participent à l'activation des NKs. En accord avec ce dernier point, il a été démontré que l'expression du gène ICP0 du VHS-1 est suffisante pour induire la surexpression des ligands des NCRs aux cellules infectées, initiant la réponse NK (459, 460).

La réponse des NK à la cellule infectée au VHS-1 semble aussi être dépendante de la présence des CDs. En effet, la déplétion des CDs chez la souris a perturbé l'expression d'IFN- γ et la fonction cytolytique des NK au cours de l'infection par le VHS-1. Par la suite, il a été démontré que la production d'IL-18 par les pCDs activées est nécessaire pour l'activation des NKs (461, 462). De plus, leur activation semble être aussi dépendante de la stimulation des pCDs par TNF- α produit par les monocytes infectés par le VHS-1 (463). D'un autre côté, une autre étude *in vivo* a montré que ce sont les monocytes recrutés à l'aide de CCL2 qui produisent l'IL-18 nécessaire à l'activation des NKs IL-18R⁺ producteurs d'IFN- γ (464). Les NKs sont également essentielles pour l'induction de la réponse LT spécifique au VHS-1. En effet, la déplétion de ces cellules à l'aide d'anticorps anti-NK1.1 a causé une diminution du nombre de LT CD8⁺ cytotoxiques, ce qui a rendu les souris plus sensibles envers l'infection par le VHS-1 (465). La qualité de la réponse LT CD8⁺ a aussi besoin de la présence des LT CD4⁺ Th1 activés par les NKs. Même si ce ne sont pas des cellules présentatrices d'antigènes professionnelles, il a été montré qu'elles augmentent l'expression de HLA-DR et HLA-DQ

du CMH-II et établissent un contact physique pour activer la réponse LT CD4⁺ au cours de l'infection par le VHS-1 (466, 467).

En 1994, Tamesis et ses collègues ont montré que le traitement d'anticorps anti-asialo GMI (pour « *Ganglio-N-tetraosylceramide* »), déplaçant les NKs de la souris infectée par le VHS-1 par la voie oculaire, améliore la kératite. Ces résultats ont suggéré que la réponse NK pourrait être une des raisons de l'inflammation exacerbée menant à la mortalité (468). Ensuite, une des études préliminaires sur les NKs dans l'EH a pointé une possible contribution de ces cellules dans le contrôle de l'infection en montrant que les souris E26 déficientes en LT et NK sont mortes suite à l'EH, contrairement aux souris déficientes seulement en LT qui ont survécu (469). Une autre étude a montré que la déplétion seule des NKs ne cause pas de dissémination du VHS-1, initialement restreint au tronc cérébral de la souris C57/BL6, dans tout le cerveau que l'on observe suite à la déplétion des LTs en même temps que les NKs (470). F. Almerigogna et ses collègues ont rapporté en 2011 que l'incidence de l'EH est plus élevée chez les enfants ayant des déficiences en NKs. En se basant sur l'observation de certains haplotypes communs de KIR chez les patients d'EH, une inhibition excessive de l'activité NK a été également montrée comme un des éléments possibles favorisant le développement de cette maladie (471). Chez la souris, la comparaison des niveaux de résistance des C57/BL6 et BALB/C envers l'EH a révélé l'effet protecteur du locus « *Herpes resistance locus-2* » (Hrl2) sur le chromosome 6, médié par les NK1.1⁺ NKs. (472, 473). L'infiltration précoce des NKs aux cerveaux des C57/BL6 a été également citée comme un des éléments permettant à ces souris d'avoir une meilleure clairance virale (449). Leur effet bénéfique a aussi été démontré par l'augmentation des titres viraux dans le tronc cérébral, suite à la déplétion des NKs chez la souris atteinte d'EH. De plus, la même étude a suggéré que l'axe CXCL10/CXCR3 contrôle le recrutement des NKs dans le SNC (474).

5.2.2. Les LTs (LT)

L'infiltration des LTs antiviraux dans le SNC est essentielle pour le contrôle des encéphalites virales, dont l'EH. Ces LTs sont dérivés des progéniteurs lymphoïdes communs produits par la moelle osseuse qui migrent vers le thymus pour subir des étapes de maturation et de sélection avant de rejoindre la circulation. Dans le thymus, le réarrangement génique permettant la génération d'un répertoire de LT ayant différents TCR induit l'expression de

CD4 et CD8 chez les précurseurs immatures CD4⁻ CD8⁻. Par la suite, ces thymocytes doubles positifs subissent des étapes de sélection en fonction de l'affinité de leur TCR pour les protéines du soi, telles que les ligands de CMH exprimés par les cellules épithéliales du thymus, afin d'éliminer celles qui ont une affinité élevée ou qui n'en ont aucune. Enfin, ces doubles positifs sélectionnés se différencient en cellules LT CD8⁺, LT CD4⁺, Treg (cellule T régulatrice) ou NKT (*cellule T Natural Killer*) (475). Les NKT sont cytotoxiques et capables de produire des cytokines/chimiokines IFN- γ et IL-4, indispensables pour la réponse antivirale. Malgré l'expression de TCR, l'activation de ces cellules n'est pas restreinte au CMH, comme c'est le cas pour les LT, grâce à l'expression de récepteurs comme NK1.1 (476). Suite à la rencontre des LT naïves avec un nouvel antigène présenté, ces cellules s'activent et deviennent des cellules T mémoires capables de proliférer et persister pour longtemps. En fonction de la présence des différents signaux inflammatoires au cours de leur différenciation, les LT CD4⁺ acquièrent un phénotype spécifique et deviennent Th1, Th2, Th17, Treg ou bien « *Follicular T helper lymphocytes* » (Tfh) (477).

Les LTs ont été retrouvés dès la quatrième journée suite à l'infection des souris avec le VHS-1. Au début, la permissivité de ces cellules à l'infection *in vitro* au VHS-1, a fait penser qu'elles peuvent causer la dissémination du virus dans le corps (478, 479). Au contraire, la sensibilité accrue au VHS-1 observée chez les souris avec certains haplotypes de H2, tels que H-2K associé à une faible induction de la réponse immunitaire, a suggéré que l'activation des LTs CD8⁺ *via* le CMH-I peut avoir un effet protecteur dans les infections du SN (480). En parallèle, la déplétion des LT CD8⁺ avec les anticorps anti-CD8 a perturbé la clairance virale et a augmenté le nombre de neurones morts chez les souris inoculées avec le VHS-1 par voie cutanée (481). Une autre étude a montré que la réponse LT CD8⁺ est nécessaire pour garder le VHS-1 en état latent dans les GT, en montrant sa réactivation suite à la déplétion des LT CD8⁺ chez les souris infectées par voie oculaire (482). Les Tregs ont été montrés comme des cellules candidates pour rétablir la latence du VHS-1. Il a été relevé que l'augmentation de la concentration des glucocorticoïdes suite à l'exposition à un facteur de stress cause la réactivation de la réplication lytique du VHS-1, en activant les Tregs, qui inhibent les fonctions des LT CD8⁺ nécessaires à garder le virus en état de latence (483). Plus tard, les LT mémoires résidants CD103⁺ ont été suggérés être responsables de la clairance virale, au lieu des LT mémoires circulants recrutés dans les tissus infectés au VHS-1 (484).

Contrairement aux LT CD8⁺, le transfert adoptif des LT CD4⁺ immunisés avec l'antigène gB aux souris immunodéficientes a exercé un effet protecteur contre l'infection au VHS-1. Les LT CD4⁺ semblent inhiber la réplication virale dans le SNC sans avoir besoin d'utiliser des mécanismes lytiques basés sur l'activité de la perforine ou bien de Fas. De plus, ces cellules secrètent de l'IFN- γ , TNF- α , IL-2 et IL-4 (485, 486). L'étude sur NKT a montré que l'absence de ces cellules chez la souris déficiente en CD1 a perturbé la clairance du VHS-1. Ces cellules diminuent également le nombre de virus en latence dans les ganglions spinaux (487, 488).

Les LTs CD8⁺ et CD4⁺ infiltrants représentent une des populations dominantes dans l'EH (489). Le retard de l'infiltration des LT CD8⁺ empire le pronostic de l'EH chez la souris. De plus, la présence de ces cellules spécifiques au VHS-1 dans le cerveau avant l'infection des souris améliore le pronostic de la maladie (490). Koyanagi et ses collègues ont montré que l'infiltration des LT CD8⁺ dans le cerveau infecté par VHS-1 dépend de CXCL9, inhibé par la kinase virale UL13. Le même groupe a démontré que l'injection directe de CXCL9 dans le SNC permet d'augmenter l'infiltration des LT CD8⁺ et améliore la survie des souris atteintes d'EH (491). Une autre étude a montré que les LT CD8⁺ sont capables d'inhiber la réplication virale *via* la production d'IFN- γ et de granzyme B dans les tissus infectés au VHS-1. Cependant, elles infiltrent ces tissus en retard, ce qui empêche l'inhibition de la dissémination du virus vers le SNC (492). Il existe des études qui montrent que l'infiltration des LT CD4⁺ comme Th1 est autant importante que celle des LT CD8⁺ dans le contrôle de l'EH (493).

L'exposition prolongée des LT résidents aux antigènes viraux dans l'épendyme rend ces cellules non fonctionnelles et elles se mettent à exprimer des marqueurs d'état d'épuisement comme LAG-3 (pour « *Lymphocyte Activation Gene-3* »), TIM-3 (pour « *T-cell immunoglobulin and mucin-domain containing-3* ») et PD1 (pour « *Programmed cell death protein 1* »). De plus, la même étude a suggéré que la latence du VHS-1 post-EH est due à la présence de ces LT épuisés (494). L'observation de l'infiltration des LT CD45⁺ CD3 ϵ ⁺ accompagnée d'une hausse de l'expression d'ARN d'IFN- γ même après la résolution de l'EH a mené à la question si ces cellules contribuent à la neuroinflammation responsable des séquelles (374). En parallèle, la diminution des lésions focales suite à la déplétion de LT

CD8⁺ chez la souris SJL atteinte d'EH a suggéré que l'infiltration de ces cellules peut être responsable de l'aggravation de la maladie (495). Malgré ces études rapportant des effets néfastes des LT CD8⁺ cytotoxiques, la réponse immunitaire médiée par ces dernières est majoritairement acceptée comme bénéfique dans l'EH (496).

5.2.3. Les LBs (LB)

Les progéniteurs communs lymphoïdes produits par la moelle osseuse, passent par différentes phases de maturation, comme pro, pré-LB, et LBs immatures, avant de devenir des LB matures. Les LBs expriment le BCR (Le récepteur des LBs), un immunoglobuline transmembranaire et de CD79, qui leur permet de s'activer (497). Les pré-LBs subissent la recombinaison V(D)J, l'étape où plusieurs évènements de recombinaison d'ADN permettant de générer le BCR unique, pour devenir des LBs immatures exprimant le pré-BCR, qui est un IgM. Après des étapes de la recombinaison V(D)J et de sélections, majoritairement basées sur l'affinité du pré-BCR pour les protéines du soi, les LBs naïves quittent la moelle osseuse et migrent vers la rate où elles deviennent soit des LBs folliculaires (LBf), soit des LBs de la zone marginale (LBZM). Les LBZMs captent les antigènes se trouvant dans le sang et ils se différencient rapidement en plasmocytes sécrétant des IgM. L'activation des LBf nécessite l'apport de l'antigène par les cellules présentatrices d'antigènes, dans les organes lymphoïdes secondaires. À la suite de leur activation, les LBfs présentent ces antigènes au Th à l'aide du CMH-II. En retour, elles reçoivent le signal CD40L et les cytokines du Th, nécessaires pour former les centres germinatifs où ces LBs activés font la commutation isotypique, et puis prolifèrent. Cette étape sert à modifier la partie de la région constante de la chaîne lourde des Igs, sans modifier la région variable de la chaîne lourde. Ensuite, les LBfs donnent naissance aux LB mémoires exprimant IgG, IgE ou IgA membranaires ou bien aux plasmocytes capables de sécréter ces anticorps (498, 499).

Les anticorps produits par ces LBs sont cruciaux dans l'immunité contre les agents infectieux, dont le VHS-1. En plus des anticorps, ces cellules produisent du TNF- α , IL-6 et IL-10 qui sont impliquées dans le contrôle de l'infection virale, mais également dans la modulation de la réponse des autres cellules immunitaires (500). En 1982, une étude a rapporté que l'inhibition des LBs par les anticorps anti-IgM administrés à la souris infectée par le VHS-1 *via* l'inoculation cutanée a induit la dissémination du virus dans le SNC et a

favorisé la latence (501). Les IgM produit par les LB, autrement appelés les anticorps naturels, permettent de limiter l'infection cutanée au VHS-1 en neutralisant les molécules virales. La souris déficiente en LB, plus susceptible à l'infection au VHS-1, a permis de montrer que les LBs font de la présentation d'antigène du VHS-1 et participent à l'activation des LT CD4⁺. En l'absence de ces cellules, non seulement la production d'anticorps, mais aussi la réponse LT CD4⁺ et la production d'IFN- γ par ces derniers ont été perturbés (502). Les plasmocytes IgD⁺ CD138⁺ IRF-4⁺ ont été colocalisés avec les LT CD4⁺ dans les tissus humains infectées au VHS-2. Il a été démontré qu'en plus des plasmocytes, les LBs naïfs IgD⁺ ont été également observés dans le tissu pendant la réactivation du VHS-2 chez l'Homme. Contrairement aux LTs, ces cellules semblent infiltrer les tissus, plutôt que résider dans les tissus après la primo-infection (503). Une autre étude réalisée sur les souris déficientes en différentes molécules du système du complément a suggéré que la génération des LBs mémoires contre le VHS-1 est dépendante du système du complément. La diminution de la production d'anticorps chez les souris Cr3^{-/-} et Cr4^{-/-} et l'absence des LBs mémoires contre le VHS-1 chez la souris Cr2^{-/-} ont supporté cette hypothèse (504).

Plusieurs études ont rapporté que l'absence des LB chez la souris infectée au VHS-1 détériore l'EH. Il a été démontré que ces cellules sont nécessaires pour l'activation de la réponse des LT *via* la présentation d'antigène, et également pour la production d'anticorps limitant la dissémination du virus de l'œil au cerveau (505). Cependant, une autre étude a mis en question l'importance du rôle des LB dans l'activation de la réponse LT, en montrant que juste le transfert passif des anticorps chez la souris déplétée de LBs suffit pour rétablir la protection contre l'EH (506).

Chez les patients atteints d'EH, le moment de la séroconversion pour le VHS-1 correspond au pic de l'infiltration des LBs (135, 507). Il a été montré que les anticorps anti-HSV-1 du sang persistent longtemps chez les patients avec EH, comparé à ceux du LCR (508). Cependant, on considère que la réponse cellulaire est plus importante pour contrôler l'infection par le VHS-1 que la réponse humorale. La présence des anticorps autoréactifs, tels que les anticorps contre le récepteur du NMDA impliqué dans l'apprentissage et la mémoire, dans le LCR de ces patients avec EH amène la question de l'existence potentielle

d'un lien entre l'infiltration des LB et l'apparition des maladies auto-immunes et/ou neurodégénératives chez ces patients (509).

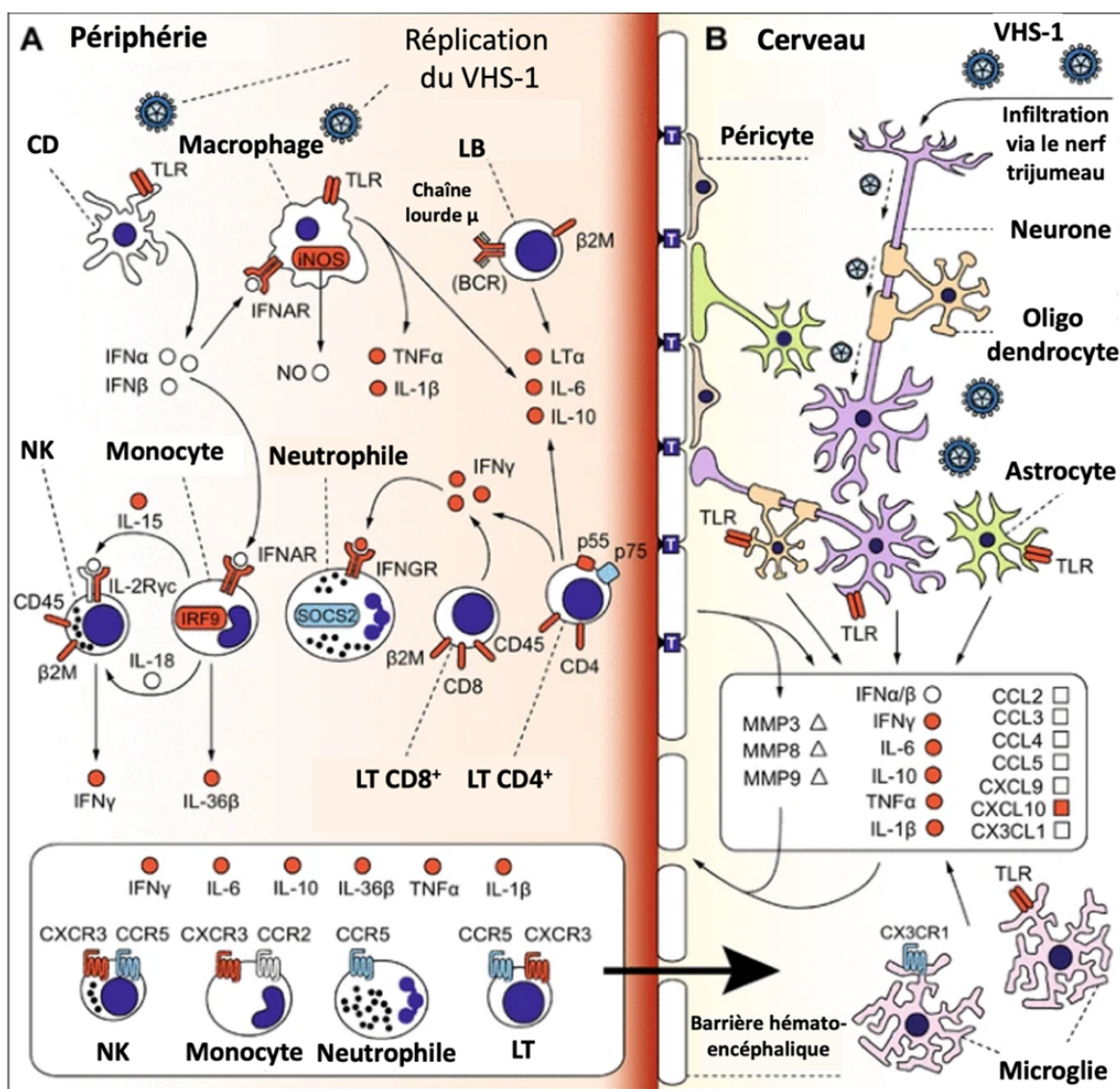


Figure-17 : Les cellules et les facteurs génétiques essentiels impliqués dans la réponse immunitaire au cours de l'EH chez la souris.

Adapté de (238): A) Le VHS-1 infecte les cellules épithéliales et les kératinocytes où il se réplique. La première rencontre avec le VHS-1 active les voies des chimiokines et les cellules dendritiques (DC) pour produire de l'IFN-I. Les macrophages et les monocytes répondent à l'IFN-I et produisent des cytokines inflammatoires (TNF- α , IL-1 β) qui contribuent à l'activation des cellules NK productrices d'IFN- γ cytotoxiques. De plus, les LB,

LT CD4⁺ effecteurs et les LT CD8⁺ cytotoxiques, aident à maintenir une réponse antivirale adéquate, y compris la production d'IFN- γ par les LT, qui favorise l'expansion des neutrophiles. La déplétion d'un des gènes codant pour CD45, β 2M, chaîne lourde μ (BCR), LT α , CD4, CD8, RAG-1 (pour « *Recombination Activating 1* »), RAG-2 et IL-2R γ c augmente la sensibilité à l'EH chez la souris. B) Dans le SNC, la voie principale d'entrée du HSV semble passer par les axones des GT. Une fois infiltré, le VHS-1 peut infecter facilement les neurones, ainsi que les glies. La reconnaissance du VHS-1 par les TLRs peut entraîner l'expression de cytokines, notamment l'IFN-I, l'IFN- γ , l'IL-6, le TNF- α et l'IL-1 β . Avec les MMP-3, -8, -9, ces cytokines du SNC et celles produites en périphérie peuvent perturber la BHE, en affaiblissant les JS (marquées en « T ») entre les cellules endothéliales. Enfin, l'expression de diverses chimiokines par les cellules résidentes du SNC conduit au recrutement des cellules immunitaires (CCR2/CCL2 ; CCR5/CCL3, CCL4, CCL5 ; CXCR3/CXCL9, CXCL10 ; CX3CR1/CX3CL1) dans le SNC à travers la BHE perturbée. Dans le SNC, ces cellules immunitaires infiltrantes peuvent améliorer la clairance du virus, mais aussi contribuer à la physiopathologie. Les voies indiquées ci-dessus ont été directement impliquées dans les études d'EH chez la souris, mais ne reflètent pas la totalité des événements retrouvés dans l'EH humaine. Pour chaque anomalie génétique signalée chez la souris, la protéine est codée par couleur ci-dessous comme suit : Rouge : pour les anomalies génétiques qui augmentent la sensibilité au VHS-1 dans au moins un modèle de souris. Bleu : pour les souris déficientes en ce gène pour lesquelles il n'y a pas eu d'effet ou ce qui a induit une résistance à l'EH par rapport aux souris témoins sauvages. Blanc : pour les gènes qui n'ont pas été testés chez la souris.

5.3. Les autres cellules immunitaires

Les éosinophiles, les basophiles et les mastocytes ont été moins étudiés dans l'EH. Bien que l'ensemble de ces cellules représente moins de 10% de tous les leucocytes dans le sang chez l'Homme, on les trouve dans les tissus infectés avec le VHS-1. Une étude réalisée sur la peau humaine infectée au VHS ou au VVZ a révélé que plus d'un tiers des patients a eu une infiltration d'éosinophiles (510). Ces granulocytes, identifiables par leur expression de CCR3 et SiglecF chez la souris, sont recrutés dans les tissus à l'aide de CCL1. Une fois infiltrés, ils produisent majoritairement de IL-5, IL-3 et GM-CSF. Les éosinophiles sont souvent connus pour leur implication dans le contrôle des infections parasitaires, en relargant

leurs granules contenant plusieurs enzymes, comme la peroxydase, ARNase, ADNase, lipase et du plasminogène (511, 512). Les éosinophiles ont été aussi retrouvés dans le LCR de plusieurs patients atteints d'une méningite ou bien d'une EH (513).

Les mastocytes sont des cellules qu'on ne trouve pas en circulation. Les progéniteurs de ces cellules, commun aux cellules myéloïdes, se différencient en mastocytes sous l'influence des signaux présents dans les tissus. Leur cytoplasme contiennent plusieurs centaines de granules, remplies majoritairement d'histamine, héparine, et plusieurs autres protéases et cytokines. La liaison de différents Igs aux récepteurs Fc active la dégranulation des mastocytes (514). Il a été démontré que la production de TNF- α et IL-6 par les mastocytes suite à leur activation par l'IL-33 produit par le kératinocyte infecté permet de limiter l'infection (515). La déplétion de ces cellules a causé une augmentation des titres du VHS-1 et de l'œdème cornéen chez les souris infectées par la voie oculaire. De plus, la même étude a suggéré que l'infiltration d'un nombre plus important de neutrophiles perturbe la perméabilité des vaisseaux, responsable de l'œdème cornéen (516).

L'autre type de granulocytes retrouvés dans les infections par le VHS est le basophile. Ces cellules représentent moins de 1% de tous les leucocytes du sang. Similaires aux mastocytes, les basophiles libèrent des granules remplis d'histamine et d'autres médiateurs, suite à leur activation *via* plusieurs mécanismes, dont l'activation par la liaison des IgE au Fc ϵ RI. Les basophiles ayant une durée de vie très courte quittent la moelle en état fonctionnels, sans avoir besoin d'une étape de maturation tissulaire. Ils participent également à l'activation de la réponse humorale et aussi à la différenciation des Th2 (517, 518). Les basophiles, aussi retrouvés dans le LCR des patients atteints d'EH, réagissent *in vitro* aux IgE, qui sont produits suite à l'infection cutanée des lapins par VHS-1 ou VHS-2, et libèrent de l'histamine (513, 519). D'autres études sont nécessaires afin de mieux comprendre les rôles de toutes ces autres cellules immunitaires dans l'EH.

6. Les mécanismes d'échappement immunitaire du VHS-1

Il existe une course entre le VHS-1 et l'immunité antivirale de l'Homme. Grâce aux différentes stratégies d'évasion, le VHS-1 arrive à coexister avec l'Homme depuis longtemps (520). Plusieurs protéines du VHS-1 sont capable d'interagir avec les molécules des cascades

de signalisation impliquées dans la réponse immunitaire afin de limiter sa détection par le système immunitaire et de l'inhiber (**Tableau-II**). Dès l'entrée du VHS-1 dans la cellule, les protéines virales commencent à modifier le métabolisme cellulaire et moduler la réponse antivirale (**Tableau-III**) (40). Tel que décrit précédemment, la VP16 exploite deux protéines cellulaires, l'Oct-1 et l'HCF-1, pour former un complexe protéique capable de se lier au génome viral et activer la transcription des gènes IE (521). De son côté, la cellule infectée détecte la présence virale et arrête la synthèse protéique. Par exemple, la PKR activée par les ARNdb du VHS-1 phosphoryle eIF-2a et l'inhibe, afin d'empêcher la traduction de toutes sortes de protéines dont les protéines virales. Cependant, l'ICP34.5 forme un complexe avec la PP1 α (pour « *Nuclear Protein Phosphatase 1 α* ») pour réactiver la synthèse protéique, en déphosphorylant l'eIF-2a nécessaire pour ce processus (522).

La vhs dégrade plusieurs ARNm de la cellule hôte, inhibe la production de IL-1 β , IL-8, CCL3, etc. et rend ces cellules insensibles aux IFNs (523). En plus de cela, cette protéine virale inhibe le CMH-I/-II, qui empêche la lyse des cellules infectées par les LT CD8⁺, prévenant ainsi la présentation d'antigène nécessaire pour l'activation de l'immunité humorale (524, 525). Différentes sortes de dysfonctionnement observés chez les cellules immunitaires infectées au VHS-1 ont indiqué que le VHS-1 est capable de perturber la réponse immunitaire. L'inhibition de CD1d exprimé par les NKT, permettant la présentation des antigènes lipidiques aux LT, fait partie de la liste de ces dysfonctionnements. Plus tard, il a été rapporté que l'ensemble de l'US3 et la gB activent l'internalisation du CD1d et sa relocalisation dans le RTG, pour inhiber les NKT (526, 527). Une étude *in vitro* a démontré que l'ICP0 favorise la dégradation d'IFI16 nécessaire pour le NLRP3 inflammasome, *via* le protéasome, ce qui cause une production réduite de IL-1 β nécessaire pour limiter les infections par le VHS (224). En collaboration avec l'USP7, l'ICP0 semble ainsi inhiber la phosphorylation des molécules, telles que JNK et I κ B, impliqués dans la signalisation de TLR-4 (528).

Le VHS-1 perturbe les voies de la mort cellulaire et prolonge la vie de sa cellule hôte afin de l'exploiter comme une usine au VHS. La stimulation de TNFR conduit à l'activation de la caspase-8 ou bien RIP (pour « *Receptor-interacting protein* »)-1 ou -3, responsable d'initier l'apoptose ou la nécroptose, respectivement. L'ICP6, ICP10 ou le transcrit LAT sont

connus pour perturber ces mécanismes (529-531). Le Fas activant l'apoptose semble aussi être inhibé par les gJ et gD (532). De plus, l'infection des macrophages active l'expression de Fas/FasL qui induit l'apoptose des NKs interagissant avec ces macrophages infectés par le VHS-1 (422). Un autre mécanisme de mort cellulaire, l'autophagie, semble également être inhibé par le VHS-1. Il a été suggéré que l'ICP0 déclenche la dégradation *via* le protéasome de la p62/SQSTM1 (pour « *Autophagy adaptor protein sequestosome* ») et de l'OPTN (pour « *Mitophagy adaptor optineurin* »), qui sont des protéines impliquées dans la réponse inflammatoire et antioxydante (533).

Un autre mécanisme que le VHS-1 exploite afin de perdurer tout au long de la vie de son hôte est la latence. Une diminution, voire l'absence, de la synthèse protéique durant la latence, permet au VHS-1 de rester à l'abri de l'immunité. Il a été montré que l'expression de LAT induisant une surexpression de PD-L1 et le CMH-I chez les cellules de neuroblastome de souris (Neuro2A), pourrait favoriser l'épuisement fonctionnel des LT CD8⁺ dans les TG infectés (534). Ce dernier point montre que les ARN du VHS-1 sembleraient être impliqués dans l'évasion immunitaire.

Tableau-II : Principales protéines virales impliquées dans l'évasion immunitaire

Protéines virales	Rôle dans l'évasion immunitaire
pUS3	Hyperphosphorylation et inhibition de l'IRF3 Inhibition l'expression de TLR3 Dégradation de bclaf2 Inhibition de l'ubiquitination de TRAF6 Inhibition de la phosphorylation de la sous-unité IFNGR1 Inhibition la translocation nucléaire de la β -caténine Inhibe la fonction de la tapasine
pUS11	Inhibition de RIG-I et MDA5 Inhibition l'activation de la PKR
UL13 (ICP0)	Inhibition l'activation d'IRF3 et d'IRF7 Dégradation IFI16 Inhibition l'activation de STING Inhibition la phosphorylation de STAT1 Induction de la diminution de l'expression de MyD88 Inhibition de l'activation de TLR2
UL36 (VP1-2)	Désubiquitination de TRAF3 Blockage du recrutement de TBK1
UL37	Inhibition de RIG-I
UL41 (vhs)	Dégradation de l'ARNm de l'hôte pour inhiber la traduction de l'ISG Inhibition de l'accumulation d'ADN viral dans le cytoplasme cellulaire Inhibition la phosphorylation de eIF2 α Induction de la diminution de l'expression de cGAS
UL46	Inhibition l'interaction de TBK1-IRF3 et la dimérisation de TBK1
UL48 (VP16)	Inhibition d'interaction d'IRF3 avec CBP Inhibition de la production ISG induite par MAVS-Pex Blockage de la liaison de NF- κ B à la région promotrice
UI54 (ICP27)	Inhibition la phosphorylation et la translocation nucléaire de STAT1 Inhibition la signalisation en aval de TBK1 et STING Dégradation de l'ARNm de l'hôte pour inhiber la traduction de l'ISG
RL1 (ICP34.5)	Inhibition de TBK1 Contrôle de l'activité de l'IRF3 Inhibition de TAP Inhibition de la phosphorylation de eIF2 α Inhibition de l'activation de STING

Adapté de (241, 535, 536) : Différentes voies de signalisation de l'immunité sont ciblées par les protéines du VHS-1 pour limiter sa détection. Le VHS-1 inhibe directement les récepteurs cytosoliques d'ADN comme cGAS et IFI16, et d'ADN comme TLR3, RIG-I et MDA5. Les molécules de signalisation, notamment MyD88, TRAF6, STING et TBK-1 peuvent être inhibées par le VHS-1 pour empêcher la translocation nucléaire de IRF3/7 et NF- κ B, responsable de l'activation de la production d'IFN et de diverses cytokines. Le VHS-1 inhibe aussi directement IRF3/7 et NF- κ B. Le VHS-1 a également évolué pour inhiber directement la voie de signalisation d'IFN, en inhibant la phosphorylation de JAK1 ainsi que la phosphorylation de STAT1 et sa translocation vers le noyau, en induisant une baisse de la production d'ISG.

Tableau-III : Principaux mécanismes d'évasion immunitaire du VHS-1

Protéines/transcripts de VHS-1	Fonction du composant viral	Rôle dans l'évasion immunitaire
ICP34.5	Déphosphorylation de l'eIF-2a par le complexe ICP34.5/PP1 α	Activation de la synthèse protéique bloquée à la suite de la détection du virus (522)
ICP0	Altération du fonctionnement des IRFs suite à leur interaction	Diminution de la production d'IFN et l'expression des ISGs (537)
vhs	Dégradation des gènes impliqués dans la présentation d'antigènes CMH-I/II	Inhibition de la lyse des cellules infectées par les LT CD8 ⁺ (524)
ICP47	La liaison d'ICP47 à TAP impliquée dans le transport de l'antigène	Inhibition de la présentation d'antigène sur le CMH-I (538)
U _s 11	Inhibition de l'activation de la RNase L de la cellule hôte	Inhibition de la dégradation de l'ARN viral (539)
gE/gI	Formation d'un complexe avec FcR	Inhibition de l'activation de la cytotoxicité cellulaire dépendante de l'anticorps associée au complément suite à l'interaction du complexe avec immunoglobulines spécifiques au VHS-1 (540)
LAT	Induction de la surexpression de PD-L1	Épuisement fonctionnel de LT CD8 ⁺ (534)

CHAPITRE-I

1. Les hypothèses et les objectifs de recherche

Les VHS infectent les cellules du SNC et causent l'EH, potentiellement mortelle. Cette infection a également des conséquences physiques, cognitives et sociales importantes pour les survivants. La majorité de ces survivants souffrent des séquelles neurologiques dues à une perte neuronale et une BHE perturbée, causées par la réplication virale ainsi que par l'inflammation qui semble en même temps être primordiale pour limiter la dissémination de l'infection. La corticothérapie complémentaire améliorant le pronostic de l'EH montre l'effet délétère de cette réponse inflammatoire. En revanche, la mortalité plus élevée chez les personnes immunodéprimées atteintes d'EH souligne que le contrôle de cette infection nécessite une bonne réponse immunitaire. Des études réalisées chez des modèles animaux et chez l'humain suggèrent que le cerveau infecté avec le VHS-1 est infiltré par les cellules immunitaires de la périphérie. Le recrutement tardif de ces cellules au moment du pic de l'infection semble ne pas être efficace pour contrôler la dissémination du VHS-1. De plus, les cellules infiltrantes peuvent aussi contribuer à l'exacerbation de l'inflammation.

La microglie, qui est la cellule immunitaire innée résidente du SNC, joue un rôle majeur dans le contrôle de l'infection et du processus inflammatoire. La microglie réactive change de morphologie, devient phagocytaire et exprime des niveaux accrus d'antigènes du CMH impliqués dans la présentation d'antigène. De plus, ces cellules libèrent des cytokines/chimiokines qui amplifient la réponse inflammatoire en activant et en recrutant d'autres cellules aux sites des régions infectées du cerveau. L'ensemble de ces connaissances montre que la microglie représente une cellule d'intérêt qui pourrait permettre de limiter l'infection, moduler la réponse inflammatoire et aussi coordonner l'infiltration des cellules immunitaires de la périphérie au cours de l'EH. En contrepartie, des études sur certaines conditions neuropathologiques suggèrent que cette réponse microgliale pourrait devenir néfaste. Le rôle controversé des microglies reste peu connu dans le cadre de l'EH. Alors, il est nécessaire de mieux définir les phénotypes microgliales considérés « neurotoxiques » contribuant à l'exacerbation de la réponse inflammatoire. Nous pensons qu'une étude transcriptomique des microglies dans l'EH, permettrait d'identifier différentes voies

moléculaires impliquées dans ce changement du phénotype microglial « bénéfique » vers « néfaste », que nous pourrions éventuellement inhiber afin d'inhiber l'apparition de ce phénotype « néfaste ». Nous avons donc décidé d'approfondir la compréhension de la réponse microgliale dans l'EH, ce qui pourrait nous aider pour le développement de nouvelles stratégies thérapeutiques contre cette maladie.

Ce projet de doctorat vise principalement à comprendre quel est l'impact des microglies sur le contrôle et l'exacerbation de l'EH expérimentale, mais aussi de comprendre le rôle et les mécanismes d'action des microglies au cours de l'infection du SNC par le VHS-1. Mon hypothèse de travail est que la réponse microgliale, essentielle pour le contrôle de l'infection en phase précoce, deviendrait incontrôlée à la suite de l'internalisation du VHS-1 et participerait à l'exacerbation de l'inflammation et au mauvais pronostic de l'EH expérimentale.

Pour répondre à cette hypothèse, trois objectifs et sous-objectifs ont été définis:

1. Générer un virus herpès simplex I recombinant neurovirulent, qui permettrait d'étudier plusieurs aspects de la pathogenèse de l'EH, incluant la dissémination du virus, les régions les plus infectées du cerveau et également la perturbation de la barrière hémato-encéphalique, dans des modèles *in vivo*.
 - Mettre en place le système CRISPR-Cas9 pour l'édition génomique du VHS-1
 - Évaluer l'impact de l'insertion des gènes rapporteurs dans la région intergénique non-codante d'UL26-UL27 sur le phénotype viral
 - Établir un système de semi-quantification des titres viraux cérébraux à l'aide du signal bioluminescent détecté dans le sang des souris infectées par le rVHS-1, sans avoir besoin de faire des sacrifices et des titrations de cerveaux
 - Établir un système d'évaluation qualitative de la BHE à l'aide d'IVIS

2. Évaluer l'impact des microglies, ainsi qu'un nombre plus élevé de microglies en phase précoce, dans le contrôle et l'exacerbation de l'EH expérimentale.
 - Évaluer l'impact du M-CSF sur le pronostic de l'EH
 - Étudier l'effet du M-CSF sur le nombre et le phénotype microglial
 - Évaluer l'effet de la déplétion microgliale sur le pronostic de l'EH

- Étudier l'effet de la déplétion microgliale sur la réponse immunitaire dans l'EH
3. Caractériser les mécanismes d'action des microglies situées dans les régions hautement infectées du cerveau, et comprendre leur contribution dans la réponse pro-inflammatoire délétère.
- Identifier la région cérébrale la plus infectée au pic de l'EH
 - Localiser le VHS-1 dans la microglie à l'aide de la microscopie électronique
 - Étudier le transcriptome des microglies isolées de la région hautement infectée

Les résultats de ces trois objectifs et sous-objectifs de recherche sont présentés dans les chapitres -II, -III et -IV de cette thèse.

2. Aperçu des résultats et contribution scientifique :

Nos travaux ont d'abord permis de générer un virus herpès simplex I recombinant neurovirulent, qui nous a aidé à démontrer que la barrière hémato-encéphalique était perturbée durant l'encéphalite herpétique. En sachant que la réponse immunitaire incontrôlée altère la perméabilité de la BHE, nous avons décidé d'évaluer la contribution de la microglie dans cette réponse inflammatoire. Nos résultats ont montré que ces cellules sont cruciales pour le contrôle de l'EH. De plus, nos travaux ont souligné l'importance d'identifier et de tester des molécules immunomodulatrices, telles que M-CSF, qui permettraient de contrôler la réponse microgliale et améliorer le pronostic de cette infection. Enfin, l'analyse transcriptomique ainsi que l'imagerie par la microscopie électronique des microglies situées dans le noyau postéro-ventriculaire du thalamus au pic de l'infection, identifiée comme la région la plus infectée du cerveau à l'aide du VHS-1 recombinant, a révélé la présence de microglies ayant internalisé les virions et qui acquéraient un phénotype pro-inflammatoire, au mauvais pronostic de cette maladie.

Chapitre-II : La génération et la caractérisation d'un nouveau virus herpès simplex 1 recombinant permettant la surveillance *in vivo* de l'EH expérimentale

Avant-propos

Le chapitre-II correspond à un article « **A novel bioluminescent herpes simplex virus 1 for *in vivo* monitoring of herpes simplex encephalitis** » dont je suis le premier auteur et qui a été publié dans la revue « *Scientific Reports* » en 21 Septembre 2021.

PMID: 34548521 - DOI: [10.1038/s41598-021-98047-z](https://doi.org/10.1038/s41598-021-98047-z)

1. Résumé

Le virus herpès simplex 1 (VHS-1) est responsable de l'encéphalite herpétique (EH), associée à un taux de mortalité de 70 % en l'absence de traitement. Malgré l'acyclovir, la mortalité reste élevée et la majorité des survivants souffrent des séquelles neurologiques. Ces dernières montrent qu'il faut continuer à développer et tester des nouveaux agents anti-herpétiques. Dans cet article, nous décrivons la génération et la caractérisation d'un nouveau VHS-1 recombinant neurovirulent (rVHS-1), exprimant le tdTomato (une protéine fluorescente) et Gluc (une enzyme catalysant une réaction bioluminescente), générée par CRISPR (pour « *Clustered regularly interspaced short palindromic repeats* ») – Cas9 (pour « *CRISPR-associated protein 9* ») (CRISPR/Cas9). L'activité Gluc mesurée dans le surnageant de culture cellulaire a été corrélée ($P = 0,0001$) aux titres viraux, ce qui a permis d'avoir un suivi *in vitro* de la cinétique de réplication virale. Une corrélation significative a également été trouvée entre les titres viraux cérébraux et l'activité de Gluc dans le plasma ($R^2 = 0,8510$, $P < 0,0001$) prélevé des souris BALB/c infectées par voie intranasale avec le rVHS-1. En analysant l'activité Gluc dans des échantillons de plasma des souris, nous avons pu effectuer une évaluation du traitement valacyclovir (VACV) au cours de l'EH expérimentale. Enfin, il a également été possible de visualiser la dissémination du rVHS-1 et en plus d'estimer les titres viraux cérébraux par la quantité de la lumière émise, à l'aide d'IVIS. Le nouveau rVHS-1 exprimant des protéines rapporteuses représente un outil puissant pour évaluer *in vitro* et *in vivo* des nouveaux antiviraux, mais aussi pour étudier différents aspects de la pathogenèse de l'EH.

2. Abstract

Herpes simplex virus 1 (HSV-1) is responsible for herpes simplex virus encephalitis (HSE), associated with a 70% mortality rate in the absence of treatment. Despite intravenous treatment with acyclovir, mortality remains significant, highlighting the need for new anti-herpetic agents. Herein, we describe a novel neurovirulent recombinant HSV-1 (rHSV-1), expressing the fluorescent tdTomato and Gaussia luciferase (Gluc) enzyme, generated by the Clustered regularly interspaced short palindromic repeats (CRISPR) – CRISPR-associated protein 9 (Cas9) (CRISPR-Cas9) system. The Gluc activity measured in the cell culture supernatant was correlated ($P=0.0001$) with infectious particles, allowing *in vitro* monitoring of viral replication kinetics. A significant correlation was also found between brain viral titers and Gluc activity in plasma ($R^2=0.8510$, $P < 0.0001$) collected from BALB/c mice infected intranasally with rHSV-1. Furthermore, evaluation of valacyclovir (VACV) treatment of HSE could also be performed by analyzing Gluc activity in mouse plasma samples. Finally, it was also possible to study rHSV-1 dissemination and additionally to estimate brain viral titers by *in vivo* imaging system (IVIS). The new rHSV-1 with reporter proteins is not only as a powerful tool for *in vitro* and *in vivo* antiviral screening, but can also be used for studying different aspects of HSE pathogenesis.

3. Article 1

A novel bioluminescent herpes simplex virus 1 for *in vivo* monitoring of herpes simplex encephalitis

Olus Uyar¹, Pier-Luc Plante², Jocelyne Piret¹, Marie-Christine Venable¹, Julie Carbonneau¹,
Jacques Corbeil², and Guy Boivin^{1*}

¹Research Center in Infectious Diseases, CHU de Québec- Laval University Research Center and Department of Pediatrics and Microbiology, Faculty of Medicine, Laval University, Quebec City, QC, Canada

²Research Center in Infectious Diseases, CHU de Québec- Laval University Research Center and Department of Molecular Medicine and Big Data Research Centre, Faculty of Medicine, Laval University, Quebec City, QC, Canada

*** Correspondence:** Guy.Boivin@crchudequebec.ulaval.ca

Abstract word count: 199

Main text word count: 4670

Figures: 7

Supplementary Figures: 2

Table: 1

3.1. Introduction

Herpes simplex virus 1 (HSV-1), a member of the *Alphaherpesvirinae* subfamily, is a neurotropic virus composed of approximately 150 kb of linear dsDNA¹. This neurotropic virus infects more than 60% of the world population and establishes lifelong latent infection in sensory neurons, mainly in trigeminal ganglia². Although most infections appear to be asymptomatic or mild, HSV-1 infection can also result in life-threatening conditions such as herpes simplex virus encephalitis (HSE) and neonatal infections³. HSE is an uncommon neurological infection, while it remains the most frequent lethal sporadic acute viral encephalitis worldwide. Despite acyclovir therapy, the mortality rate of patients with HSE is approximately 30%⁴. Moreover, most surviving patients still suffer from significant neurologic impairments because of neuronal and glial damage caused by viral replication and subsequent inflammation. It is also known that the permeability of the blood-brain barrier (BBB) is altered during HSE, leading to progressive neuroinflammation that contributes to neuropathological sequelae⁵.

HSE studies in mice usually require the sacrifice of animals at specific time-points to harvest the brain that will be used for histological or molecular analyses⁶. However, these methods based on sequential sacrifices prevent longitudinal observations of infected animals. Recombinant HSV-1, engineered by different genome-editing strategies, such as bacterial artificial chromosome (BAC) recombination, allowed to identify viral gene functions of HSV-1 and characterize mutations affecting the pathophysiology of HSE. Unfortunately, genomic engineering of clinical strains is highly complex, and many of these recombinant viruses exhibited attenuated virulence in animal models⁷. Recently, Clustered regularly interspaced short palindromic repeats (CRISPR) – CRISPR-associated protein 9 (Cas9) (CRISPR-Cas9) system was adapted for DNA editing in mammalian cells, which makes genomic manipulation of large viral DNA sequences easier and more efficient⁸. This new method first induces a specific double-strand DNA break (DSB) by an RNA-guided nuclease, then enables genome editing by repairing DSB via either error-prone non-homologous end joining (NHEJ) or homology-directed repair (HDR). Several recombinant herpes viruses, including HSV-1, were produced using the CRISPR-Cas9 system and can be used to conduct virus-host interaction studies^{9,10}.

Recombinant pathogens expressing different types of luciferase have enabled the monitoring of infections by *in vivo* bioluminescence imaging (BLI). This non-invasive imaging method allows real-time visualization of central nervous system (CNS) infections on a single animal throughout the course of infection ¹¹. Moreover, the emerging use of the CRISPR-Cas9 system made the generation of recombinant viruses expressing reporter proteins easier. The latter approach enabled observing the dissemination of neurotropic viruses into the CNS and identifying anatomic regions of the brain where high levels of viral replication occur ¹². Despite these recent advances, the application of BLI in HSE studies remains limited.

This study describes the generation and characterization of a novel recombinant herpes simplex virus 1 (rHSV-1) designed as a BLI tool to monitor HSE in living mice. Neurovirulent rHSV-1 was created by inserting two reporter genes coding for tdTomato fluorescent protein and Gaussia Luciferase (Gluc) enzyme, into the UL26-UL27 intergenic region of clinical HSV-1 strain H25, via Cas9-guide RNA (gRNA)-induced HDR strategy. After isolation of rHSV-1, the recombination event was validated by PCR and whole genome sequencing (WGS). Further, we studied *in vitro* and *in vivo* correlations between brain viral titers and relative light units (RLU) emission from different biological samples. As a proof-of-concept, we first evaluated the effect of valacyclovir treatment in HSE by analyzing Gluc activity in mouse plasma. Secondly, we used the newly generated rHSV-1 to study viral dissemination into the CNS and examine the BBB integrity by BLI. Here, we propose that rHSV-1 is a powerful tool for *in vitro* and *in vivo* antiviral screening and for studying HSE pathogenesis.

3.2. Results

Generation and isolation of recombinant HSV-1

The transfection/infection approach was performed to generate rHSV-1 expressing Gluc and tdTomato reporter proteins, using the CRISPR-Cas9 system ¹³. Briefly, this method consists of transfecting host cells with a mixture of CRISPR-Cas9/gRNA and the donor plasmid prior to their infection with the virus to modify (Fig. 1, two workflows: (i) gRNA selection and (ii) rHSV-1 production and validation). We designed three gRNAs (Table 1) to induce the viral DNA cleavage in the UL26-UL27 non-coding intergenic region, which was already well-characterized

^{13,14}. *In silico* analysis on CHOPCHOP suggested a more significant efficiency (61.23 %) for gRNA-2 to create the DSB.

Heterozygous peaks between 64th and 80th nucleotides of PCR amplicons corresponding to NHEJ-mediated repair into the gRNA-2 target site were observed on Sanger sequencing chromatogram (Fig. 2a, top). Based on our initial observations, we assumed that gRNA-2 modified-viral pool contained at least 15 to 20% of mutant HSV-1 ^{15,16}. In addition, the indel analysis on the UL26-UL27 amplicons of mutant HSV-1 showed that mutation frequencies were higher in gRNA-2 edited HSV-1 fragments (highest indel frequency for gRNA-2: 27%) compared to other gRNA target sites (Fig. 2a, bottom).

Next, the exogenous fragment carrying reporter genes, with flanking 128 pb left and 150 pb right homology arms, was introduced into the virus genome by HDR of CRISPR-Cas9-induced DSB. Two reporter genes under the control of cytomegalovirus (CMV) major immediate-early (MIE) promoter were connected with 2A sequence coding for a self-cleaving peptide. This allows the co-expression of two reporter proteins from a single mRNA ¹⁷. The open reading frame (ORF) was adjusted by the addition of two nucleotides (-TA), and the bovine growth hormone (bgh) polyadenylation signal was placed downstream from the tdTomato gene and its stop codon. Moreover, we introduced a protospacer adjacent motif (PAM) altering-mutation that changed –GGG to –GGA to avoid re-cutting the recombinant virus genome, as reported elsewhere (Supplementary Fig. 1) ¹⁸. The progeny virus was identified, and a single HSV-1 tdTomato⁺ plaque was isolated under a fluorescence microscope (Fig. 2b). Further, tdTomato expression was evaluated in rHSV-1-infected cells by a confocal microscope. Infected Vero cells were immunostained with an antibody anti-HSV-1 protein (Fig. 2c). Finally, we confirmed by PCR that the whole insert was present in the UL26-UL27 intergenic region of isolated rHSV-1 (Fig. 2d).

Whole-genome characterization of the recombinant HSV-1

The mutation acquired during the generation/isolation process of rHSV-1 may alter the viral phenotype. Thus, we analyzed the whole genomes of wild-type (WT) HSV-1 and rHSV-1 by WGS. As previously shown, WGS and assembly of HSV-1 is highly challenging due to high GC content and multiple repeat sequences ¹⁹. To this end, Sanger sequences were used in combination with Illumina short reads. Overall, sequencing depth varied from 1 to over 300 in some regions

when aligning reads to HSV-1 strain 17 reference genome (Fig. 3a). Most coding regions were fully covered, allowing to perform variant calling. Overall, 438 variations were found between strain H25 and strain 17 coding sequences. The variations were dispersed in most regions, except for the sequences of UL45 to ICP0, which mainly remained unchanged.

Analysis of the multiplexed PCR assay showed a variable coverage between 1447 and 7997, 100 bp before and after the expected position of the insertion, with a depth of 5756x on the insertion junction (Fig. 3b). Comparatively, no reads from the PCR assay aligned to HSV-1 strain 17 genome. Similar results were observed, but with a lower sequencing depth, when using WGS data and aligning the reads on HSV-1 strain 17 genome (Fig. 3c).

Variant calling of rHSV-1 on WT HSV-1 *de novo* assembled contigs showed 12 single nucleotide polymorphisms (SNPs), three of them resulting in a substitution, five being silent mutations on coding regions and four mutations on small contigs that could not be aligned to a coding region. The three missense substitutions appeared in three different proteins (UL29, UL38 and UL41) during the generation and isolation process of rHSV-1. Val361Ile (position on reference genome: 56727) substitution was found in UL29 encoding ICP8 that plays a crucial role in viral DNA replication. ICP8 promotes helicase activity of helicase-primase complex (UL5-UL8-UL52) of HSV-1. The residues between 332 to 564 of ICP8 were claimed to be involved in DNA binding²⁰. UL38 gene, encoding triplex capsid protein VP19C, had a Leu156Val substitution (position on reference genome: 80699)²¹. Random insertions occurring in the central region of VP19C can affect viral growth²². A Thr461Ile substitution (position on reference genome: 88254) was detected in UL41 encoding for virion host shutoff (vhs) protein. This viral RNase suppresses all cellular protein synthesis during HSV-1 infection²³. It is known that vhs may help HSV-1 evade immune responses by inhibiting mechanisms such as cyclic GMP-AMP synthase-stimulator of interferon genes (cGAS/STING) interferon- β activation pathway²⁴. This newly identified substitution is located in region III (amino acids 365 to 489) of UL41 polypeptide, where mutations could potentially enhance viral replication²⁵.

At last, gRNA off-target activity was analyzed to understand if these mutations could be induced by CRISPR-Cas9 system. First results on CHOPCHOP with a closely related HSV-1 genome (HSV-1 strain 17, GenBank: JN555585.1) showed no possible off-target for selected

gRNAs. Further *in silico* analysis by searching homology between gRNAs and WT WGS reads also confirmed that no off-target modification was possible using these gRNAs.

Introduction of reporter genes into UL26-UL27 intergenic region did not alter *in vitro* viral replicative capacity

The replicative capacity of the WT and rHSV-1 strains was evaluated in Vero cells by real-time cell analysis (RTCA) and confirmed by plaque assay. Two different multiplicity of infection (MOIs) of 0.01 and 0.001 were used to infect cells, and the cell index (CI) was recorded for 4 days. We found that the viral replicative capacity of rHSV-1 remained unchanged compared to WT HSV-1 for both MOIs (Fig. 4a, b). We confirmed our data by comparing the replication capabilities of WT and rHSV-1 by plaque assay. Once again, we observed similar trends in replication kinetics (Fig. 4c) of both viruses, suggesting that neither the large foreign genes in the intergenic region of UL26-UL27 nor previously described SNPs in the rHSV-1 genome seem to have a significant impact on *in vitro* replication properties.

Enhanced neurovirulence of rHSV-1 does not result in higher mortality rates

We then examined whether rHSV-1 remained as neurotropic as the WT HSV-1 strain H25 after genomic modifications. To evaluate the neurovirulence of rHSV-1, we infected BALB/c mice intranasally with 1 500 plaque forming unit (PFU) of WT or rHSV-1. On day 6 post-infection (p.i.), brain sections stained for HSV-1 proteins were analyzed by immunofluorescence microscopy. The detection of tdTomato⁺ CNS cells on rHSV-1-infected brain sections proved that rHSV-1 was able to infect the CNS (Fig. 4d). This observation was also validated by colocalized signals of tdTomato (rHSV-1) and GFP (HSV-1 proteins) on rHSV-1 infected CNS cells (Supplementary Fig. 2a). Although we observed lower tdTomato⁺ spots than those of GFP⁺, there was no difference in distribution patterns of infectious spots in CNS of rHSV-1- or WT HSV-1-infected mice (Supplementary Fig. 2b).

We further studied mortality rates and *in vivo* replicative kinetics of rHSV-1 in BALB/c mice infected intranasally with 1 500 PFU of WT or rHSV-1. We observed similar mortality rates for both strains (Fig. 4e, 75% for WT HSV-1 vs 83.4% for rHSV-1, P-value: 0.29, non-significant). Viral titers in the CNS of rHSV-1-infected mice were 2.7 times higher than those infected with

WT HSV-1 (Fig.4f, 21 808 PFU/mg in WT brains, 58 643 PFU/mg in rHSV-1; P-value: 0.003) on day 6 p.i. These results suggest that, although rHSV-1 was associated with increased *in vivo* replicative capacity compared to WT, the two strains had similar mortality rates.

***In vitro* and *in vivo* viral titers correlate with secreted Gluc activity**

Standard viral titration techniques are time-consuming and labor-intensive. To overcome these limitations, we determined whether the activity of secreted Gluc was correlated with the growth kinetics of rHSV-1. We measured cell culture supernatant viral titers by plaque assay (Fig. 5a), then performed a Gluc activity assay on those supernatants (Fig. 5b). As expected, Gluc activity was observed only in cells infected with rHSV-1. Significant RLU values were detected as early as 8 hours post-infection (h p.i.) and reached a maximum at 42 h p.i. with more than 80% of Vero cells infected by rHSV-1. Significant correlations were observed between Gluc activity and PFUs (Fig. 5c, R^2 : 0.86, P-value <0.0001) in cell culture supernatants. Overall, these data suggest that rHSV-1 *in vitro* replication can be monitored by Gluc assay.

Furthermore, we measured *ex vivo* Gluc activities in brain, blood and urine samples collected from rHSV-1-infected mice prior to and on days 4 and 6 p.i. A correlation study between viral titers in the CNS and RLUs obtained from the same samples was conducted. Positive correlation between brain viral titers and Gluc activity in mouse samples was observed for urine, plasma, and brain supernatant samples (Fig. 5d, urine: $R^2 = 0.7784$, P-value: 0.0001; Fig. 5e, plasma: $R^2 = 0.8510$, P-value < 0.0001; Fig. 5f, brain supernatant: $R^2 = 0.7146$, P-value < 0.0001). However, we did not observe any correlation between Gluc activity in whole blood and viral titers in the CNS, suggesting an incompatibility of the Gluc test with whole blood. These results indicate that an accurate estimate of viral titers in the CNS could be performed by Gluc assay in readily accessible samples such as plasma and urine.

Rapid assessment of antiviral compounds against HSE by measuring luciferase activity in plasma samples of mice

We first evaluated the effective acyclovir concentration that reduced the cytopathic effects by 50% (EC50s) for both WT and rHSV-1. The EC50 of acyclovir against WT and rHSV-1 strains in Vero cells were, respectively, 1.567 ± 0.306 $\mu\text{g/mL}$ and 0.947 ± 0.129 $\mu\text{g/mL}$ by plaque

reduction assay (PRA). Based on a 1.65-fold decrease in EC50s of rHSV-1 (compared to EC50s of WT HSV-1; P-value: 0.1, non-significant), we concluded that there was no significant change in acyclovir susceptibility between these two viruses.

The poor outcome of HSE despite acyclovir therapy underlines the need for new antiviral and anti-inflammatory compounds. We suggest that our *in vivo* antiviral drug testing method based on plasma Gluc activity, correlating with viral titers in the CNS, may accelerate the evaluation of new drugs. As a proof of concept, we assessed the effect of valacyclovir (VACV; a prodrug of acyclovir) on viral titers by measuring plasma Gluc activity on days 0, 4 and 6 p.i. We infected BALB/c mice intranasally with 2 500 PFU of rHSV-1 and treated them with VACV (1 mg/mL in drinking water *ad libitum*) from day 3 p.i. and on, as described elsewhere ²⁶. The effect of valacyclovir on weight and survival rate of infected mice was evaluated for 14 days. VACV-treated mice exhibited a significant increase in survival rate compared to control mice that did not receive VACV (Fig. 6a, 35% for VACV, 0% for control; P-value: 0.04). In addition, mice that received VACV demonstrated significantly lower body weight loss than control mice on days 5 and 6 p.i. (Fig. 6b, P-value: 0.038 and 0.003, respectively). Finally, the impact of VACV on viral titers in CNS was investigated. We observed a 20-fold increase in viral titers in the CNS of control mice on day 4 p.i. (compared to VACV-treated mice; P-value > 0.99, non-significant). Viral titers were significantly lower in brain homogenates of VACV-treated mice on day 6 p.i. (Fig. 6c, 320 833 PFU/mg of brain in control vs 42 291.8 PFU/mg of brain in VACV-treated mice; P-value 0.0029).

We then evaluated the activity of Gluc in plasma samples at different time points to assess whether RLU kinetics follow the same trend as viral titers in the CNS. As expected, plasma RLU values of VACV-treated animals were significantly lower on day 6 p.i., compared to those from the control group (Fig. 6d, P-value: 0.04, 178.75 RLU for VACV group vs 3 178 RLU for the control group). Once again, we validated the positive correlation between RLUs obtained from plasma samples and viral titers in the CNS. (Fig. 6e, $R^2 = 0.8958$, P-value < 0.0001). Altogether, our data suggest that plasma Gluc activity correlates with viral titers in the CNS during an antiviral intervention.

Real-time monitoring of rHSV-1-induced HSE

To detect the presence of rHSV-1 *in vivo*, we inoculated BALB/c mice intranasally with 1 500 PFU of rHSV-1 or WT HSV-1. Following intravenous injection of coelenterazine (CTZ), we could visualize bioluminescence signals produced by Gluc activity in the CNS of rHSV-1-infected mice on days 4, 6 and 8 p.i. (Fig. 7a). As expected, there was no signal detected in mice infected with WT HSV-1.

The time course of rHSV-1 dissemination from the nasal cavity into the CNS parenchyma was investigated by analyzing various rHSV-1-infected BALB/c mouse images from different time points. We noticed that the first signal in the CNS appeared on day 4 p.i. in olfactory bulbs, corresponding to the early stage of the disease (Fig. 7b – rHSV-1#2). On days 4 and 6 p.i., an intense signal emerged from the eye of some infected mice (Fig. 7b, rHSV-1#3, rHSV-1#4, rHSV-1#5). Simultaneously, the diencephalon and several spots in the mesencephalon were detected (Fig. 7b, rHSV-1#4 and rHSV-1#5). BLI on day 8 p.i. also revealed an infectious site in an area that we assume to be the piriform cortex, a part of the central olfactory tract (Fig. 7a, Mouse V, Day 8: Infection Resolution). In addition, immunofluorescence (IF) studies on HSV-1-infected brain sections showed that optic tract, olfactory tubercule, bed nuclei of stria terminalis and paraventricular hypothalamic nucleus were the main infected areas on day 6 p.i. (Supplementary Fig. 2b, c)). Overall, we suggest that HSV-1 uses the olfactory pathway and visual circuitry to disseminate into the thalamus and hypothalamus ²⁷.

Next, we evaluated whether IVIS-detected bioluminescence intensity (total flux (p/s) in manually defined Regions of Interest (ROIs)) emitted from the CNS correlates with brain viral titers (Fig. 7b). The correlation study conducted on five animals at different time points (Fig. 7b, table) suggested a strong correlation (R^2 : 0.9996, P-value <0.0001, not shown) between these two parameters. Our result demonstrates the potential of BLI to monitor viral titers in the CNS simply by measuring bioluminescent signals on IVIS-acquired images.

BLI of rHSV-1-infected mice reveals blood-brain barrier damage during HSE

The BBB is a highly specialized structure formed by microvascular endothelial cells joined by tight junctions. CNS infections by a neurotropic virus may disrupt the BBB. It has been shown

that neither Gluc nor its substrate, CTZ, can cross the BBB^{28,29}. Our objective was to evaluate whether infection with HSV-1 alters the integrity of the BBB by BLI.

We injected i.p. CTZ to rHSV-1 infected mice on day 6 p.i. Following the CTZ administration, multiple image acquisitions (with an interval of 3 min) on the same mouse revealed the bioavailability of Gluc in different organs. First, signals appeared from i.p. injection site to the kidney and spleen (Fig. 7c, blue spots on image t). However, no signal was emitted from the CNS until the 6th min (Fig. 7c, image t + 6 min). Signals from the right side of the mouse body started to quench with CTZ diffusing into the systemic circulation³⁰. We noticed that some CNS regions, including olfactory bulbs, diencephalon, and eyes, began to emit signals during this shift. As expected, no signal emerged from control mice infected with WT strain (Fig. 7c, mouse on the right side). Altogether, we speculate that CNS infection by HSV-1 leads to a dysfunctional BBB, allowing CTZ to diffuse into the brain parenchyma and Gluc to accumulate in different organs.

To confirm BBB disruption, we used intravenous Evans Blue dye (EBD) injection in rHSV-1-infected mice on day 6 p.i. to visualize dye extravasation into the brain parenchyma. Following the i.v. EBD injection, we harvested the brain to observe if EBD could cross BBB (Fig. 7d, top). Our observations on day 4 p.i. indicate that BBB disruption occurred in olfactory bulbs. On day 6 p.i., the olfactory bulbs were intensively stained with EBD. We also noticed that the BBB disruption progressed towards the mesencephalon on day 6 p.i., precisely towards the superior colliculus. The brain sections also showed that EBD was present in the thalamus and around the hypothalamic paraventricular nucleus. Moreover, western blot (WB) with Claudin-5, a tight junction protein, showed a significant decrease of its expression on day 6 p.i. (Fig. 7d, bottom). Altogether, this data indicates that rHSV-1 causes BBB disruption that can be rapidly evaluated by an intraperitoneal CTZ injection.

3.3. Discussion

Our study describes the development of a neurovirulent rHSV-1 expressing fluorescent tdTomato protein and Gluc enzyme, which constitutes a promising tool to study HSE pathogenesis. Many research groups have edited the HSV-1 genome for decades by traditional viral genome editing strategies such as chemical mutagenesis, site-directed mutagenesis by HDR, overlapping

cosmid clones and the BAC system. These approaches can generate infectious HSVs used for studying gene function and mutations³¹⁻³³. To our knowledge, the generation and characterization of a neurovirulent rHSV-1 obtained by genetically modifying a clinical strain have not been described yet.

BAC technology provides a way to generate recombinant HSVs. However, this system remains challenging because of the requirement of cloning the large HSV-1 genome into a BAC vector. In many studies, newly-identified mutations in clinical HSV-1 isolates are inserted into the BAC-cloned genome of a laboratory strain, rather than cloning the whole genome of the new clinical strain with novel mutations into the BAC,³⁴. Moreover, the insertion of long vectors like BACs usually results in phenotypic changes, including altered viral growth and even a neurovirulence attenuation, which is problematic for HSE studies³⁵. One proposed solution to avoid the loss of neurovirulence was to excise loxP sites flanking the BAC by Cre recombinase³⁶. The targeted genomic region chosen to introduce exogenous fragments should be well characterized to limit HSV-1 neurovirulence attenuation. In our study, we decided to target the UL26-UL27 intergenic region of the clinical neurovirulent HSV-1 strain H25 to introduce two reporter genes. This location was already defined as a safe region to modify, with no effect on adjacent genes expression^{13,37}. However, another recent study claimed that targeting the UL26-UL27 non-coding region for genome insertions could reduce viral replication¹⁴. The replicative capacity of our rHSV-1 suggested that the insertion of exogenous fragment into this location in HSV-1 strain H25 did not affect *in vitro* viral replication. Moreover, we observed significantly higher viral titers in the CNS of rHSV-1-infected BALB/c mice on day 6 p.i. Altogether, this data indicates that the impact of the insertion of exogenous DNA on neurovirulence depends on the strain that we modify and the exact location of the insert.

Conventional viral genome engineering methods are based on HDR in *E. coli* with HSV-1 genome cloned into a BAC or a virally-infected cell line. However, because of the low frequency of the HDR, the efficiency of modifications is reduced. Our study took advantage of the increased frequency of HDR triggered by gRNA-2/Cas9 induced DSB to insert the exogenous fragment encoding two reporter proteins. On the other hand, the off-target activity of gRNA/Cas9 resulting in unwanted random mutations is a potential limitation³⁸. Based on that, we sequenced both rHSV-1 and clinical HSV-1 strain H25 (WT) to evaluate whether off-target, and other random mutations

occurred during the production and the isolation of rHSV-1. Comparative genomic analysis of the two strains by next generation sequencing (NGS) revealed 3 non-silent mutations within three different genes. We suggest that these three non-silent mutations appeared randomly during rHSV-1 purification passages³⁹. In addition, there were no phenotypic changes for rHSV-1, except an increase in neurovirulence, which could be related to Thr461Ile substitution in UL41 gene encoding vhs. We believe that such vhs mutation can alter its activity and may affect viral clearance by modulating the inflammatory response^{40,41}.

By inserting two reporter genes (encoding for Gaussia Luciferase and tdTomato), we aimed to produce rHSV-1 generating bioluminescence and fluorescence that would be used for *in vivo* imaging of infected brains during HSE by BLI and bi-photonic fluorescent microscopy⁴². The tdTomato reporter was used for viral distribution studies on brain sections without immunostaining. We observed similar distribution patterns, elicited by rHSV-1 and WT HSV-1, in BALB/c mouse brains. Interestingly, the tdTomato signal was absent on some of the GFP⁺ immunostained rHSV-1-infected brain cells. We believe that this phenomenon may be explained by slight amounts of tdTomato, compared to a large quantity of HSV-1 proteins immunostained by polyclonal antibodies. The location of the insert within the UL26-UL27 intergenic region classified as a late-transcribed gene could also lead to a late production of this fluorescent protein. However, the activity of Gluc encoded by the same insert was detected as early as 12 h p.i., suggesting that even late gene (γ) transcription starts very early throughout infection as reported previously⁴³.

Our new tool was designed to overcome many of the problems that researchers experience with HSE animal studies performed with conventional techniques. Traditional methods requiring animal sacrifices provide information for a specific time point. BLI of rHSV-1-infected mice allows studying the time course of the infection on the same animals, reducing the number of required animals and avoiding animal-to-animal variability. Before validating rHSV-1 kinetics *in vivo*, we characterized it on Vero cells. Secreted Gluc activity in infected cell culture supernatants highly correlated with viral titers, suggesting that rHSV-1 could be used as an efficient *in vitro* antiviral screening tool. Next, we analyzed Gluc activity in different biological liquids collected from mice, looking for a correlation with viral titers in the CNS. Similar to previous studies on brain tumors expressing Gluc, significant correlations were obtained, indicating that a simple

luminescence analysis of plasma samples could be used to estimate viral titers in the brains^{44,45}. As a proof-of-concept, the antiviral activity of VACV for HSE was evaluated *in vivo* by Gluc activity in plasma of rHSV-1-infected mice. Our *in vivo* antiviral study also exhibited a correlation between viral titers in brain and luminescence levels in plasma. Reduced viral titers on both days 4 and 6 p.i. in VACV-treated mice led to significantly increased survival rates.

The combination of IVIS images and immunofluorescence studies on brain sections helps identify potential dissemination routes of HSV-1 in HSE, as performed for other viruses^{46,47}. According to our observations, following intranasal infection, rHSV-1 first infiltrates the brain via olfactory nerves, then uses the main olfactory route to infect the hypothalamus, including the suprachiasmatic nucleus (SCN). Thereafter, rHSV-1 can reach the optic nerve and induce conjunctivitis. The virus subsequently migrates to different parts of the diencephalon and mesencephalon. It has already been shown that bioluminescence intensity analysis could be used to estimate infectious virus titers⁴⁸. We were also able to assess viral titers in the CNS of rHSV-1 infected mice using radiance values obtained from BLI following intravenous CTZ injection. Intraperitoneal CTZ injection revealed Gluc accumulation in different peripheral organs, suggesting that Gluc produced in the CNS can easily cross the BBB on day 6 p.i. Furthermore, the bioluminescent signal emitted from the CNS following intraperitoneal CTZ injection showed that CTZ can also cross the BBB. Based on these two observations, we assumed that the BBB was altered during the HSV-1 infection. Additionally, EBD assay on rHSV-1-infected mice revealed a significant increase of BBB permeability on day 6 p.i., compared to day 0 and day 4 p.i. We also confirmed BBB disruption by analyzing Claudin-5 expression in whole brain extracts on days 0, 4 and 6 p.i. There was a significant reduction in Claudin-5 levels on day 6 p.i., suggesting no selective exchange between the CNS and blood compartments.

An important limitation of BLI is a low spatial resolution that makes the identification of the exact location of infected areas more difficult, especially in the CNS, because of limited substrate bioavailability caused by the BBB and reduced amount of emitted light by skin and skull. However, rHSV-1 demonstrated significant advantages over conventional methods used to assess antiviral drugs in HSE by allowing to monitor CNS infection with less or non-invasive samples using bioluminescence. Our strategy highlights the feasibility of developing new recombinant HSV-1 with reporter proteins and without neurovirulence attenuation by using the CRISPR-Cas9

system on clinical strains. This new rHSV-1 reporter strain is a powerful tool to improve our knowledge of HSE pathogenesis and to simplify the assessment of therapeutic modalities.

3.4. Materials and methods

Viruses and cells

The clinical neurovirulent HSV-1 strain H25 was used to generate rHSV-1. Vero cells (ATCC #CCL-81) were cultured in minimal essential medium (MEM) (Gibco/Invitrogen) supplemented with 10% fetal bovine serum (FBS) (Wisent) and 1% HEPES (4-(2-hydroxyethyl)-1-piperazineethanesulfonic acid), at 37 °C in 5% CO₂. Viral titers were measured by plaque assays, as described elsewhere ⁴⁹.

Mice

Six-week-old male BALB/c mice were obtained from Charles River. Mice were slightly anesthetized and infected with clinical HSV-1 strain H25 or rHSV-1 in 20 µL of MEM by intranasal inoculation. Animals were monitored three times daily for 14 days and sacrificed when body weight loss $\geq 20\%$ or two other obvious sickness signs were observed. All animals were used in accordance with the Canadian Council on Animal Care guidelines, and the protocol was approved by the Animal Care Ethics Committee of Laval University (protocol no. 2017072). The study was carried out in compliance with the ARRIVE guidelines.

Guide RNAs (gRNAs) design and plasmid construction

The UL26-UL27 intergenic region of HSV-1 strain H25 was chosen to insert the exogenous fragment. gRNAs were designed using the CHOPCHOP web tool (<https://chopchop.cbu.uib.no>) and using the HSV-1 strain 17 complete genome (Sequence ID: JN555585.1) ⁵⁰. Four gRNAs were cloned into the eSpCas9(1.1) PX330-like plasmid (Addgene). Three gRNAs target the UL26-UL27 intergenic region, and one did not target the selected region and was used as a negative control. The eSpCas9 plasmids were constructed as described elsewhere ⁵¹.

The CRISPR-Cas9-induced HDR strategy was used to insert a 2918bp exogenous fragment into the viral genome. The donor plasmid was constructed by cloning two gBlocks (produced by Integrated DNA Technologies) into the pEGFP-N1 vector used as a backbone plasmid. gBlocks-1 and 2 were digested with EcoR-I/Not-I and NotI/KpnI restriction enzymes (New England Biolabs (NEB)), respectively. Digested fragments were then ligated into the respective restriction sites of the pEGFP-N1 vector in two separate steps. Next, 128 pb left, and 150 pb right homology arms were amplified and digested respectively with AseI and NotI enzymes. Digested PCR products were ligated in the respective restriction sites of the donor plasmid in two separate steps.

gRNA selection and indel mutation analysis

80-90% confluent Vero cells seeded in 6-well plates were transfected with 2 µg of gRNA/eSpCas9 plasmid. 12h post-transfection, cells were infected with HSV-1 strain H25 at a MOI of 1. After 90 min of incubation, the medium was gently aspirated. Infected cells were washed with phosphate-buffered saline (PBS) and overlaid with MEM containing 2 % FBS. To analyze the % of gRNA-mediated-NHEJ, supernatants containing a mixture of WT and mutant viruses were collected at 36 h p.i. Diluted supernatants were used to infect Vero cells in 24-well plates. Genomic DNA extractions were performed with QIAamp DNA Blood Mini Kit (Qiagen) on day 3 post-infection. The UL26-UL27 intergenic region of the virus mixture was amplified by Q5 Hot Start High-Fidelity DNA polymerase (NEB). PCR products were analyzed on a 0.8% agarose gel. The bands of interest around 1500 bp in size were gel-purified, and the first 260bp of 5' end of amplicons were analyzed by Sanger sequencing. Multiple sequence alignments using ClustalW were performed to evaluate gRNAs by verifying deletions and/or insertions of nucleotides into the UL26-UL27 intergenic region⁵². The 'Inference of CRISPR Edits' (ICE) analysis was performed to assess gRNA editing efficiency (<https://www.synthego.com/products/bioinformatics/crispr-analysis>).

Generation and isolation strategy for rHSV-1

The transfection/infection method was used to generate the recombinant virus by introducing reporter genes under the control of the CMV MIE promoter into the intergenic region of UL26-UL27 *via* HDR, as described previously¹³. Cells were transfected with 2 µg of a mixture of plasmids (gRNA and donor plasmid / 1:1 ratio) and Lipofectamine 2000 (Life Technologies) (3

$\mu\text{L}/\mu\text{g}$ DNA) in 1 mL of OptiMEM (Gibco, Thermo Fisher Scientific) for 12 h and then infected with WT HSV-1 strain H25. For the isolation of the recombinant virus, tdTomato⁺ cells were visualized by fluorescence microscopy (Nikon - Eclipse TE300 Inverted Microscope). Picked cells were resuspended in a cell culture medium and used to infect new Vero cells. Five rounds of plaque purification were performed to purify the recombinant virus before analysis.

Multiplex PCR Targeted Amplicon (MTA-Seq) and whole genome sequencing

Before the characterization of rHSV-1, we confirmed by Illumina deep sequencing that viral isolation and production steps were successfully performed without any remaining WT HSV-1 contaminant. A PCR assay followed by deep sequencing of its products was developed to identify heterogeneous viral populations, as described elsewhere^{53,54}. We designed a multiplex PCR that combines a common forward primer for both and two specific reverse primers targeting WT or recombinant HSV-1. Viral DNA was isolated with the Blood-Mini-Kit (Qiagen). Q5 Hot Start High-Fidelity DNA polymerase (NEB) was used to amplify 584bp and 543bp fragments for WT and recombinant virus, respectively. The bands of interest (between 500-650 bp) were gel-purified and then quantified by Qubit 3.0 (Thermo Fisher Scientific) to adjust the concentration before Illumina deep sequencing.

In addition to PCR products, we also sequenced the whole genomes of WT and recombinant viruses. DNA extracts were first quantified using Qubit 3.0. Then, 1 ng of each sample was used to prepare DNA libraries using the Nextera XT sample preparation kit (Illumina), according to the manufacturer's instructions. A purification step with AMPure XP beads (Beckman Coulter) to remove very short library fragments was performed prior to library normalization. The libraries were then multiplexed, clustered, and finally sequenced using the Nextera XT kit (Illumina) as described by the manufacturer, except that 10% phiX Control (Illumina) was added to the library pool. The paired-end sequencing (2×250 nucleotides [nt]) was performed on a MiSeq system (Illumina).

Reads were first demultiplexed using bcl2fastq v2.20. WT HSV-1 and rHSV-1 reads were independently aligned with HSV-1 strain 17 genome (LT576870.1) using Snippy v4.3.6 (<https://github.com/tseemann/snippy>). Using Tablet v1.19.09.03, coding regions with low to no coverage were manually identified, and PCR primers were designed to amplify and sequence these

regions using Sanger sequencing⁵⁵. The resulting Sanger sequences and Illumina reads were used to assemble the genomes using Spades genome assembler v3.13.0⁵⁶. After assembly, reads from rHSV-1 were aligned with WT HSV-1 contigs to find possible mutations using Snippy.

Reads corresponding to the multiplexed PCR of the insertion junction were aligned to the contigs from rHSV-1 containing the expected insertion and to the complete genome of HSV-1 strain 17. Coverage at each position was retrieved from the bam files using Python and PySam v0.16.0.1 (<https://github.com/pysam-developers/pysam>).

Off-target analysis for gRNAs

The initial off-target analysis was performed on CHOPCHOP while designing gRNAs. Before that, UL26-UL27 intergenic region of HSV-1 strain H25 was amplified, then Sanger sequenced. A similar HSV-1 genome (JN555585.1), also available in the reference genomes database of CHOPCHOP, was identified by the UL26-27 sequence of HSV-1 strain H25. Our initial *in silico* analysis of UL26-UL27 fragment permitted to choose three gRNAs with no potential off-targets on the reference genome (JN555585.1). Another reference genome (LT576870.1), 99.2% identical to JN555585.1, was used for WGS analysis of HSV-1 H25. As these three HSV-1 genomes were highly similar (>99%), we concluded that there were no potential off-target sites for our gRNAs on the genome of HSV-1 H25 strain. In addition, gRNA sequences were used to find sequences from the WT reads containing possible target for CRISPR-Cas9, by using BLAST (blastn-short). All 96 matching reads were aligned against the reference sequence (LT576870.1). No possible off-targets were detected using this analysis. Considering the three analyses we performed; namely CHOPCHOP on JN555585.1, gRNA blast on LT576870.1 and gRNA homology search on HSV1-WT, we concluded that no off-targets were possible for the selected gRNA.

Characterization of tdTomato expression

We first observed the expression of tdTomato *in vitro* while isolating rHSV-1. tdTomato expression was confirmed on infectious spots of rHSV-1 with immunofluorescence assays (IF). Additionally, Vero cells on cover slips were infected with isolated rHSV-1, then also immunolabeled to visualize tdTomato expression in a single cell level. The following approach

was performed for both immunofluorescence assay. Infected Vero cells were fixed 72 h.p.i. by adding 500 μ L of 4% paraformaldehyde (PFA) (30 min at room temperature (RT)). After 3 washes with 1X PBS, cells were first permeabilized by adding 500 μ L of 0.1% Triton X-100 in 1X PBS (15 min at RT), then blocked with 500 μ L of 2% bovine serum albumin in PBS (60 min at RT). Cells were incubated with HSV-1/2 polyclonal primary antibody (Bio-Rad Laboratories) for 2 h, then with secondary Alexa Fluor 488-labeled goat IgG (Invitrogen/Thermo Fisher Scientific) antibody for 45 min at RT protected from light. After three washes with 1X PBS, a fluorescent microscopy image (Fig. 2b) was captured using a Nikon fluorescence microscope (Eclipse TE300 Inverted Microscope). Image acquisition of rHSV-1-infected Vero cells (Fig. 2c) was performed (Z-stack of 11 images at 0.2- μ M intervals) with an Olympus IX80 equipped with a WaveFX-Boreal-SC Yokagawa spinning disk confocal (Quorum Technologies) and an Orca Flash4.0 camera (Hamamatsu).

Harvested brains were prepared for the immunofluorescence analysis as described elsewhere ⁵⁷. Brain sections fixed with PFA 4% were incubated with the same antibodies as mentioned above. Finally, nuclear staining was performed using DAPI. Confocal fluorescence microscopy images were captured using an Axio Imager M2 epifluorescence microscope equipped with an AxioCamMRm (Carl Zeiss Microscopy GmbH).

***In vitro* analysis of viral replicative capacities and Gluc activity**

Replication kinetics of rHSV-1 were analyzed by two *in vitro* approaches: 1) RTCA system (xCELLigence; ACEA Biosciences, Inc.) and 2) plaque assay. First, confluent Vero cells seeded in E-Plates 96 (6-wells per time point) were inoculated with WT or rHSV-1 at a MOI of 0.01 and incubated for 90 min. The viral suspension was removed and replaced by fresh culture medium (MEM plus 2% FBS). Normalized CI (cell index) values were then recorded every 30 min for 72 h, as described elsewhere ⁵⁸.

To confirm RTCA results, we compared WT and rHSV-1 replicative capacities by plaque assay. As mentioned above, confluent Vero cells seeded in 24-well plates were infected with WT or rHSV-1 at a MOI of 0.01. Briefly, cell culture supernatants from triplicate wells were sampled every 8 or 12 h for 54 h. 100 μ L of collected supernatants were used to measure viral titers.

Simultaneously, 30 μ L of the supernatant were used to determine the Gluc activity by the Gluc reporter-based assay as described elsewhere ⁵⁹.

***In vivo* analysis of neurovirulence, viral replicative capacity and Gluc activity**

BALB/c mice were infected with 1500 PFUs of clinical HSV-1 strain H25 or rHSV-1, and survival rates were compared. Luciferase activity in brain homogenates, whole blood, plasma and urine collected from rHSV-1-infected mice on days 0, 4 and 6 p.i. was measured. Brain homogenates were centrifuged at 10,000 x g for 10 min at 4°C. Blood samples (~150 μ L) were withdrawn from the facial vein of mice and collected in EDTA-coated tubes (Thermo Fisher Scientific) to prevent coagulation. For plasma isolation, half of the blood samples was centrifuged for 10 min at 1 500 x g at 4°C. Urine samples were collected by abdominal palpation. Then, blood, plasma or urine samples were used to carry out luciferase assay ⁴⁵. Except for urine samples, 30 μ L of undiluted samples were transferred to flat solid bottom and opaque-walled white 96-well laminator Costar plates (Fisher Scientific Inc). For urine sample analysis, 15 μ L of urine samples were mixed with 15 μ L of PBS 1X.

***In vivo* imaging and monitoring of HSE**

rHSV-1-infected mice were anesthetized with 2.5% vaporized isoflurane inhalation. Animals were monitored by BLI resulting from Gluc activity. To validate our HSE model, 50 μ L of Inject-A-Lume coelenterazine substrate diluted in Fuel-Inject (Nanolight Technology, Prolume Ltd.) was injected intravenously (i.v.) through the tail vein. Two min after CTZ administration, mice were imaged (60 s exposure time) with an IVIS Spectrum *in vivo* imaging system (Perkin Elmer). For BBB permeability analysis, the same amount of CTZ was injected intraperitoneally (i.p.), and 6 images were acquired at 3 min-intervals for 15 min to monitor bioluminescent signal. Data (in radiance (photons per second per square centimeter per steradian (p/s/cm²/sr)) were analyzed using Living Image 3.0 software (Perkin Elmer/Caliper Life Sciences).

Evaluation of valacyclovir treatment by bioluminescence

Susceptibility of WT and rHSV-1 to acyclovir (Sigma-Aldrich) was first tested by PRA ⁵⁸. The effect of valacyclovir (Sigma-Aldrich) treatment on HSE was evaluated by measuring bioluminescence signal resulting from Gluc activity in plasma samples. Mice were infected

intranasally with 2.5×10^3 PFU of HSV-1 strain H25. VACV (1 mg/mL in drinking water *ad libitum* from day 3 and on) was administered to infected mice, as described elsewhere ²⁶. For survival rate experiments, mice were monitored for 14 days for the appearance of HSE-related signs or death as described above. Subsets of mice were sacrificed before the infection and on days 4 and 6 p.i. Brain homogenates were prepared to quantify viral titers, as reported elsewhere ⁵⁷.

Evaluation of BBB disruption

The Evans blue dye (EBD) test was used to assess the blood-brain barrier (BBB) integrity. Non-infected control and mice infected intranasally with 1500 PFU were given 50 μ L of EBD i.v. [1% (w/v) in PBS] (Sigma) on days 0, 4 and 6 p.i. Three hours later, mice were perfused with 20 mL PBS 1X and brains were harvested and photographed to analyze EBD-stained areas visually. Western blotting was conducted by using total protein extract of the brain to detect Claudin-5. Total cellular protein was extracted by sonicating the brain in chilled Cell Lysis buffer (Sigma) followed by centrifugation at 11 000x g for 20 min, and then the soluble supernatant fraction was collected. An equal amount of total protein (50 μ g) was separated by SDS-PAGE, transferred onto nitrocellulose membrane, and incubated overnight with polyclonal antibodies against claudin-5 (Santa-Cruz Biotechnologies Inc.). Simultaneously, another membrane was prepared and incubated with polyclonal antibodies against β -catenin (Abcam) selected as a housekeeping protein. Following incubation with secondary antibodies conjugated with horseradish peroxidase (HRP), chemiluminescence assay was performed with Supersignal West Pico chemiluminescent substrate (Thermo Fisher Scientific). Uncropped images of scanned western blots shown in (d) are provided (Supplementary Fig. 3)

Statistical analyses

All statistical analyses, regression and correlation studies were performed using GraphPad Prism version 8.4.2, GraphPad Software, San Diego, California USA (www.graphpad.com), after excluding outliers by Grubb's test. A P value of < 0.05 was considered statistically significant. All data are presented as means \pm standard errors of the mean (SEM). EC50s of acyclovir against two viruses were compared by the Mann-Whitney test. Survival rates were analyzed by log-rank Mantel-Cox tests. All other data were analyzed by two-way ANOVA with Sidak's multiple comparisons test.

Data availability

The data and primer sequences that support the findings of this study are available upon request from the corresponding author. The genomic data is available through Biosample database at NCBI (accession numbers: SAMN18751846 (HSV-1 strain H25) and SAMN18751847 (rHSV-1)).

Acknowledgments

Two Foundation Grants supported this study from the Canadian Institutes of Health Research (grant no. 148361 to G.B. and grant no. 143279 to J.Co.). G.B. is the holder of the Canada Research Chair (CRC) on emerging viruses and antiviral resistance, and J.Co. holds a CRC in Medical Genomics (950-231574). P.-L.P. is the recipient of a graduate scholarship from the Fonds de Recherche du Quebec – Santé (36093). We thank Dr. Marc Bazin from Dr. Girish Shah lab for his technical support in IVIS Lumina III (PerkinElmer), Dafni Synodinou from Dr. Yannick Doyon lab for her technical assistance with the CRISPR-Cas9 system and Diogjena Katerina Prifti from Dr. Sabine Elowe lab for her technical assistance with the confocal microscopy; all are located at the CHU de Québec-Laval University Research Center. This research was enabled in part by support provided by Calcul Quebec (www.calculquebec.ca) and Compute Canada (www.computecanada.ca).

Contributions

O.U., P.L.P., G.B. and J.P., conceived and designed the study; O.U., P.L.P., M.-C.V. and J.C. performed research; O.U. and P.L.P. analyzed data; O.U. and P.L.P. prepared figures; O.U., P.L.P., J.P., G.B., and J.Co. wrote the paper. All authors reviewed the manuscript.

Declaration of interests

The authors declare no competing interests.

3.5. References

- 1 Whitley, R. J. & Roizman, B. Herpes simplex virus infections. *Lancet* **357**, 1513-1518, doi:10.1016/S0140-6736(00)04638-9 (2001).
- 2 Wertheim, J. O., Smith, M. D., Smith, D. M., Scheffler, K. & Kosakovsky Pond, S. L. Evolutionary origins of human herpes simplex viruses 1 and 2. *Mol Biol Evol* **31**, 2356-2364, doi:10.1093/molbev/msu185 (2014).
- 3 Whitley, R., Kimberlin, D. W. & Prober, C. G. in *Human Herpesviruses: Biology, Therapy, and Immunoprophylaxis* (eds A. Arvin *et al.*) (2007).
- 4 Whitley, R. J. *et al.* Vidarabine versus acyclovir therapy in herpes simplex encephalitis. *N Engl J Med* **314**, 144-149, doi:10.1056/NEJM198601163140303 (1986).
- 5 Bradshaw, M. J. & Venkatesan, A. Herpes Simplex Virus-1 Encephalitis in Adults: Pathophysiology, Diagnosis, and Management. *Neurotherapeutics* **13**, 493-508, doi:10.1007/s13311-016-0433-7 (2016).
- 6 Kollias, C. M., Huneke, R. B., Wigdahl, B. & Jennings, S. R. Animal models of herpes simplex virus immunity and pathogenesis. *J Neurovirol* **21**, 8-23, doi:10.1007/s13365-014-0302-2 (2015).
- 7 Tanaka, M., Kagawa, H., Yamanashi, Y., Sata, T. & Kawaguchi, Y. Construction of an excisable bacterial artificial chromosome containing a full-length infectious clone of herpes simplex virus type 1: viruses reconstituted from the clone exhibit wild-type properties in vitro and in vivo. *J Virol* **77**, 1382-1391, doi:10.1128/jvi.77.2.1382-1391.2003 (2003).
- 8 Suenaga, T., Kohyama, M., Hirayasu, K. & Arase, H. Engineering large viral DNA genomes using the CRISPR-Cas9 system. *Microbiol Immunol* **58**, 513-522, doi:10.1111/1348-0421.12180 (2014).
- 9 Xu, X., Che, Y. & Li, Q. HSV-1 tegument protein and the development of its genome editing technology. *Virology* **13**, 108, doi:10.1186/s12985-016-0563-x (2016).
- 10 Luo, J. *et al.* Efficient Mutagenesis of Marek's Disease Virus-Encoded microRNAs Using a CRISPR/Cas9-Based Gene Editing System. *Viruses* **12**, doi:10.3390/v12040466 (2020).
- 11 Doyle, T. C., Burns, S. M. & Contag, C. H. In vivo bioluminescence imaging for integrated studies of infection. *Cell Microbiol* **6**, 303-317, doi:10.1111/j.1462-5822.2004.00378.x (2004).

- 12 Tang, Y. D. *et al.* Recombinant Pseudorabies Virus (PRV) Expressing Firefly Luciferase Effectively Screened for CRISPR/Cas9 Single Guide RNAs and Antiviral Compounds. *Viruses* **8**, 90, doi:10.3390/v8040090 (2016).
- 13 Russell, T. A., Stefanovic, T. & Tschärke, D. C. Engineering herpes simplex viruses by infection-transfection methods including recombination site targeting by CRISPR/Cas9 nucleases. *J Virol Methods* **213**, 18-25, doi:10.1016/j.jviromet.2014.11.009 (2015).
- 14 Oh, H. S. *et al.* Herpesviral lytic gene functions render the viral genome susceptible to novel editing by CRISPR/Cas9. *Elife* **8**, doi:10.7554/eLife.51662 (2019).
- 15 Davidson, C. J. *et al.* Improving the limit of detection for Sanger sequencing: A comparison of methodologies for KRAS variant detection. *Biotechniques* **53**, 182-188, doi:10.2144/000113913 (2012).
- 16 Tsiatis, A. C. *et al.* Comparison of Sanger sequencing, pyrosequencing, and melting curve analysis for the detection of KRAS mutations: diagnostic and clinical implications. *J Mol Diagn* **12**, 425-432, doi:10.2353/jmoldx.2010.090188 (2010).
- 17 Furler, S., Paterna, J. C., Weibel, M. & Bueler, H. Recombinant AAV vectors containing the foot and mouth disease virus 2A sequence confer efficient bicistronic gene expression in cultured cells and rat substantia nigra neurons. *Gene Ther* **8**, 864-873, doi:10.1038/sj.gt.3301469 (2001).
- 18 Paquet, D. *et al.* Efficient introduction of specific homozygous and heterozygous mutations using CRISPR/Cas9. *Nature* **533**, 125-129, doi:10.1038/nature17664 (2016).
- 19 Jiao, X. *et al.* Complete Genome Sequence of Herpes Simplex Virus 1 Strain McKrae. *Microbiol Resour Announc* **8**, doi:10.1128/MRA.00993-19 (2019).
- 20 Wang, Y. S. & Hall, J. D. Characterization of a major DNA-binding domain in the herpes simplex virus type 1 DNA-binding protein (ICP8). *J Virol* **64**, 2082-2089, doi:10.1128/JVI.64.5.2082-2089.1990 (1990).
- 21 Homa, F. L. & Brown, J. C. Capsid assembly and DNA packaging in herpes simplex virus. *Rev Med Virol* **7**, 107-122, doi:10.1002/(sici)1099-1654(199707)7:2<107::aid-rmv191>3.0.co;2-m (1997).
- 22 Adamson, W. E., McNab, D., Preston, V. G. & Rixon, F. J. Mutational analysis of the herpes simplex virus triplex protein VP19C. *J Virol* **80**, 1537-1548, doi:10.1128/JVI.80.3.1537-1548.2006 (2006).

- 23 Everly, D. N., Jr., Feng, P., Mian, I. S. & Read, G. S. mRNA degradation by the virion host shutoff (Vhs) protein of herpes simplex virus: genetic and biochemical evidence that Vhs is a nuclease. *J Virol* **76**, 8560-8571, doi:10.1128/jvi.76.17.8560-8571.2002 (2002).
- 24 Smiley, J. R. Herpes simplex virus virion host shutoff protein: immune evasion mediated by a viral RNase? *J Virol* **78**, 1063-1068, doi:10.1128/jvi.78.3.1063-1068.2004 (2004).
- 25 Everly, D. N., Jr. & Read, G. S. Site-directed mutagenesis of the virion host shutoff gene (UL41) of herpes simplex virus (HSV): analysis of functional differences between HSV type 1 (HSV-1) and HSV-2 alleles. *J Virol* **73**, 9117-9129, doi:10.1128/JVI.73.11.9117-9129.1999 (1999).
- 26 Canivet, C., Menasria, R., Rheaume, C., Piret, J. & Boivin, G. 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, doi:10.1016/j.antiviral.2015.09.007 (2015).
- 27 Wojaczynski, G. J., Engel, E. A., Steren, K. E., Enquist, L. W. & Patrick Card, J. The neuroinvasive profiles of H129 (herpes simplex virus type 1) recombinants with putative anterograde-only transneuronal spread properties. *Brain Struct Funct* **220**, 1395-1420, doi:10.1007/s00429-014-0733-9 (2015).
- 28 El-Amouri, S. S., Cao, P., Miao, C. & Pan, D. Secreted luciferase for in vivo evaluation of systemic protein delivery in mice. *Mol Biotechnol* **53**, 63-73, doi:10.1007/s12033-012-9519-6 (2013).
- 29 Aswendt, M., Adamczak, J., Couillard-Despres, S. & Hoehn, M. Boosting bioluminescence neuroimaging: an optimized protocol for brain studies. *PLoS One* **8**, e55662, doi:10.1371/journal.pone.0055662 (2013).
- 30 Al Shoyaib, A., Archie, S. R. & Karamyan, V. T. Intraperitoneal Route of Drug Administration: Should it Be Used in Experimental Animal Studies? *Pharm Res* **37**, 12, doi:10.1007/s11095-019-2745-x (2019).
- 31 Warden, C., Tang, Q. & Zhu, H. Herpesvirus BACs: past, present, and future. *J Biomed Biotechnol* **2011**, 124595, doi:10.1155/2011/124595 (2011).
- 32 Kudelova, M. *et al.* Recombinant herpesviruses as tools for the study of herpesvirus biology. *Acta Virol* **57**, 149-159, doi:10.4149/av_2013_02_149 (2013).

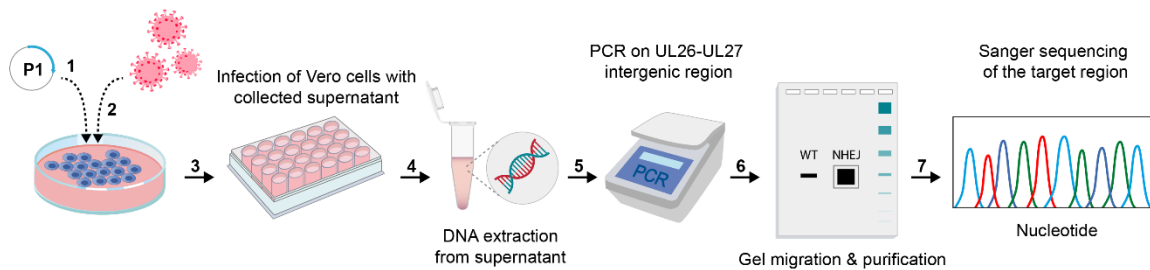
- 33 Brune, W., Messerle, M. & Koszinowski, U. H. Forward with BACs: new tools for herpesvirus genomics. *Trends Genet* **16**, 254-259, doi:10.1016/s0168-9525(00)02015-1 (2000).
- 34 Brunnemann, A. K. *et al.* Recombinant herpes simplex virus type 1 strains with targeted mutations relevant for aciclovir susceptibility. *Sci Rep* **6**, 29903, doi:10.1038/srep29903 (2016).
- 35 Gierasch, W. W. *et al.* Construction and characterization of bacterial artificial chromosomes containing HSV-1 strains 17 and KOS. *J Virol Methods* **135**, 197-206, doi:10.1016/j.jviromet.2006.03.014 (2006).
- 36 Richards, A. L., Sollars, P. J. & Smith, G. A. New tools to convert bacterial artificial chromosomes to a self-excising design and their application to a herpes simplex virus type 1 infectious clone. *BMC Biotechnol* **16**, 64, doi:10.1186/s12896-016-0295-4 (2016).
- 37 Balliet, J. W., Kushnir, A. S. & Schaffer, P. A. Construction and characterization of a herpes simplex virus type I recombinant expressing green fluorescent protein: acute phase replication and reactivation in mice. *Virology* **361**, 372-383, doi:10.1016/j.virol.2006.11.022 (2007).
- 38 Zhang, X. H., Tee, L. Y., Wang, X. G., Huang, Q. S. & Yang, S. H. Off-target Effects in CRISPR/Cas9-mediated Genome Engineering. *Mol Ther Nucleic Acids* **4**, e264, doi:10.1038/mtna.2015.37 (2015).
- 39 Kuny, C. V., Bowen, C. D., Renner, D. W., Johnston, C. M. & Szpara, M. L. In vitro evolution of herpes simplex virus 1 (HSV-1) reveals selection for syncytia and other minor variants in cell culture. *Virus Evol* **6**, veaa013, doi:10.1093/ve/veaa013 (2020).
- 40 Smith, T. J., Ackland-Berglund, C. E. & Leib, D. A. Herpes simplex virus virion host shutoff (vhs) activity alters periocular disease in mice. *J Virol* **74**, 3598-3604, doi:10.1128/jvi.74.8.3598-3604.2000 (2000).
- 41 Suzutani, T. *et al.* The role of the UL41 gene of herpes simplex virus type 1 in evasion of non-specific host defence mechanisms during primary infection. *J Gen Virol* **81**, 1763-1771, doi:10.1099/0022-1317-81-7-1763 (2000).
- 42 McGavern, D. B. & Kang, S. S. Illuminating viral infections in the nervous system. *Nat Rev Immunol* **11**, 318-329, doi:10.1038/nri2971 (2011).

- 43 Harkness, J. M., Kader, M. & DeLuca, N. A. Transcription of the herpes simplex virus 1 genome during productive and quiescent infection of neuronal and nonneuronal cells. *J Virol* **88**, 6847-6861, doi:10.1128/JVI.00516-14 (2014).
- 44 Chung, E. *et al.* Secreted Gaussia luciferase as a biomarker for monitoring tumor progression and treatment response of systemic metastases. *PLoS One* **4**, e8316, doi:10.1371/journal.pone.0008316 (2009).
- 45 Alessandrini, F., Ceresa, D., Appolloni, I., Marubbi, D. & Malatesta, P. Noninvasive Monitoring of Glioma Growth in the Mouse. *J Cancer* **7**, 1791-1797, doi:10.7150/jca.15564 (2016).
- 46 Phillips, A. T. *et al.* Bioluminescent imaging and histopathologic characterization of WEEV neuroinvasion in outbred CD-1 mice. *PLoS One* **8**, e53462, doi:10.1371/journal.pone.0053462 (2013).
- 47 Luker, G. D. *et al.* Noninvasive bioluminescence imaging of herpes simplex virus type 1 infection and therapy in living mice. *J Virol* **76**, 12149-12161, doi:10.1128/jvi.76.23.12149-12161.2002 (2002).
- 48 Czako, R. *et al.* In Vivo Imaging of Influenza Virus Infection in Immunized Mice. *mBio* **8**, doi:10.1128/mBio.00714-17 (2017).
- 49 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. *J Infect Dis* **196**, 853-860, doi:10.1086/520094 (2007).
- 50 Labun, K. *et al.* CHOPCHOP v3: expanding the CRISPR web toolbox beyond genome editing. *Nucleic Acids Res* **47**, W171-W174, doi:10.1093/nar/gkz365 (2019).
- 51 Ran, F. A. *et al.* Genome engineering using the CRISPR-Cas9 system. *Nat Protoc* **8**, 2281-2308, doi:10.1038/nprot.2013.143 (2013).
- 52 Thompson, J. D., Gibson, T. J. & Higgins, D. G. Multiple sequence alignment using ClustalW and ClustalX. *Curr Protoc Bioinformatics* **Chapter 2**, Unit 2 3, doi:10.1002/0471250953.bi0203s00 (2002).
- 53 Onda, Y., Takahagi, K., Shimizu, M., Inoue, K. & Mochida, K. Multiplex PCR Targeted Amplicon Sequencing (MTA-Seq): Simple, Flexible, and Versatile SNP Genotyping by Highly Multiplexed PCR Amplicon Sequencing. *Front Plant Sci* **9**, 201, doi:10.3389/fpls.2018.00201 (2018).

- 54 Quick, J. *et al.* Multiplex PCR method for MinION and Illumina sequencing of Zika and other virus genomes directly from clinical samples. *Nat Protoc* **12**, 1261-1276, doi:10.1038/nprot.2017.066 (2017).
- 55 Milne, I. *et al.* Using Tablet for visual exploration of second-generation sequencing data. *Brief Bioinform* **14**, 193-202, doi:10.1093/bib/bbs012 (2013).
- 56 Prjibelski, A., Antipov, D., Meleshko, D., Lapidus, A. & Korobeynikov, A. Using SPAdes De Novo Assembler. *Curr Protoc Bioinformatics* **70**, e102, doi:10.1002/cpbi.102 (2020).
- 57 Uyar, O. *et al.* An Early Microglial Response Is Needed To Efficiently Control Herpes Simplex Virus Encephalitis. *J Virol* **94**, doi:10.1128/JVI.01428-20 (2020).
- 58 Piret, J., Goyette, N. & Boivin, G. Novel Method Based on Real-Time Cell Analysis for Drug Susceptibility Testing of Herpes Simplex Virus and Human Cytomegalovirus. *J Clin Microbiol* **54**, 2120-2127, doi:10.1128/JCM.03274-15 (2016).
- 59 Drouot, E., Piret, J. & Boivin, G. Novel method based on "en passant" mutagenesis coupled with a gaussia luciferase reporter assay for studying the combined effects of human cytomegalovirus mutations. *J Clin Microbiol* **51**, 3216-3224, doi:10.1128/JCM.01275-13 (2013).

Figures:

(i) gRNA validation



(ii) rHSV-1 production and validation

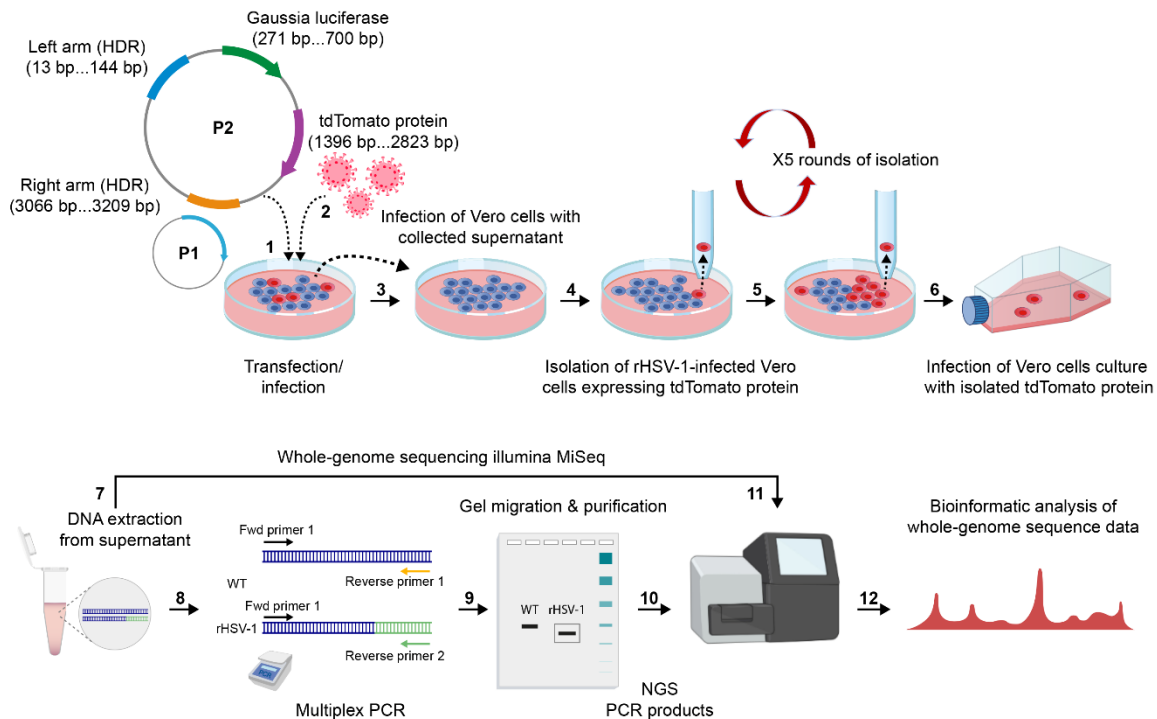


Figure 1: CRISPR-Cas9-mediated generation of recombinant HSV-1 (rHSV-1). Schematic presentation of two workflows: (i) gRNA validation and (ii) rHSV-1 production and the validation. (i) gRNA validation: Following the transfection/infection step (P1: CRISPR-Cas9 vector/ HSV-1 strain H25), collected supernatants were diluted and used to infect naïve Vero cells. Supernatant was collected and viral DNA was amplified. PCR products from the amplification of UL26-UL27 intergenic region were first gel-purified, then Sanger sequenced for NHEJ-mediated indel mutation analysis. (ii) rHSV-1 production and validation: Following the transfection/infection step (a mixture of plasmids (P1: CRISPR-Cas9 vector and P2: The HDR (homology-directed repair) donor plasmid)/ HSV-1 H25 strain), collected supernatants were used to infect naïve Vero cells. tdTomato⁺ rHSV-1 infected cells were isolated and used to infect naïve Vero cells. Five rounds of

isolation/infection process were performed to eliminate all WT HSV-1 virions from rHSV-1 viral production. Supernatant was collected and DNA extraction was performed. PCR products from multiplex PCR were gel-purified. Two viral DNAs (WT HSV-1 H25 strain, rHSV-1) and gel-purified Multiplex PCR products were deep-sequenced by using Illumina MiSeq. Bioinformatic analysis was performed for whole-genome construction of both viruses. Images were created using Adobe Illustrator (version 25.3.1/ <https://www.adobe.com/>).

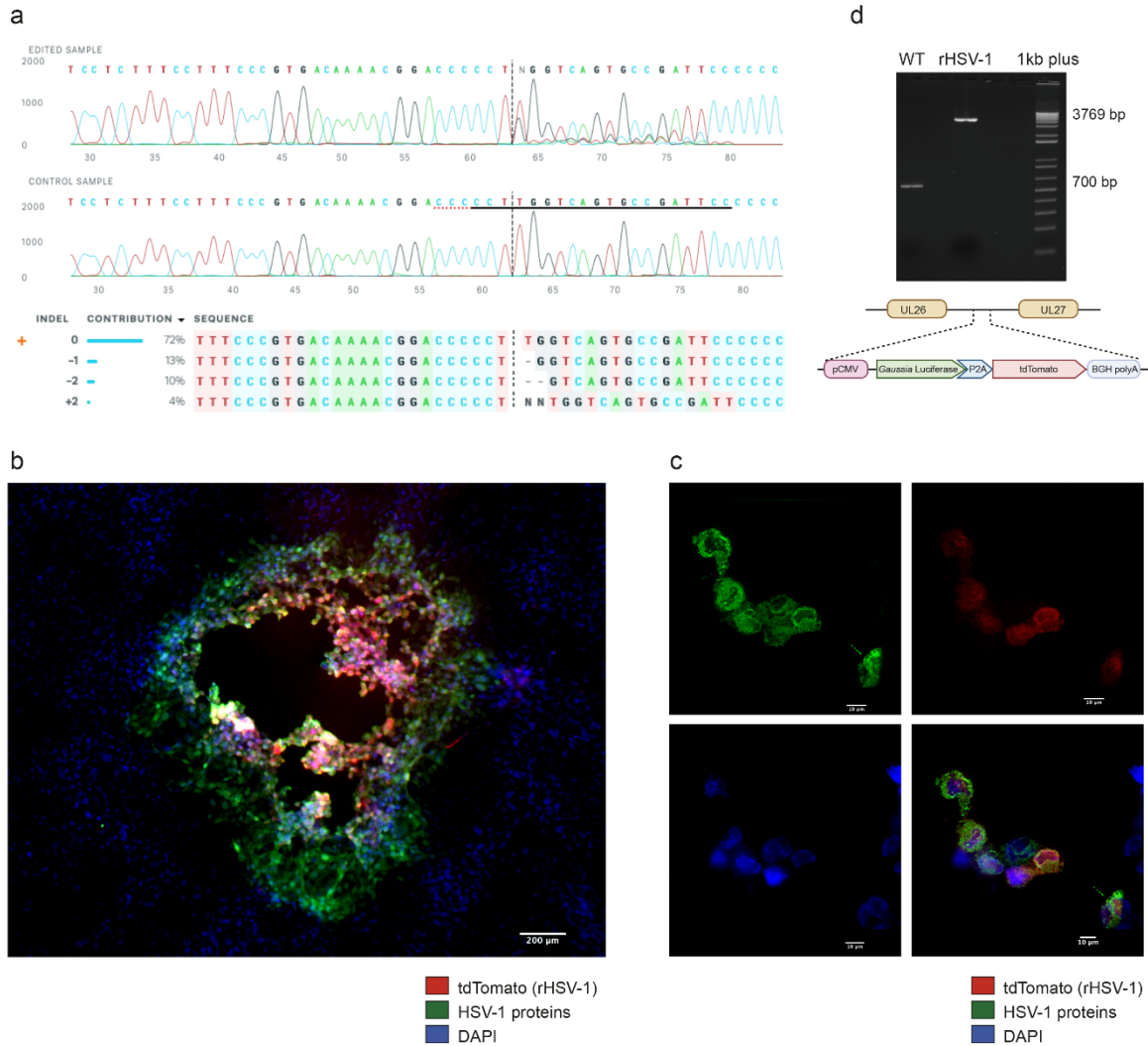


Figure 2: rHSV-1 production, isolation, and validation process (a) Validation of gRNA-2 targeting UL26-UL27 intergenic region. Sanger sequencing chromatograms of UL26-UL27 PCR amplicons from edited samples containing WT and recombinant HSV-1 show heterozygous peaks between 64th and 80th nucleotides that correspond to NHEJ-mediated indel introduction after gRNA-2 guided Cas9 cut (top). The horizontal black and red dotted-underlined regions represent gRNA and PAM sequences, respectively. Example of Inference of CRISPR Edits' (ICE) analysis on a gRNA-2-edited viral clone showing indel mutations in UL26-UL27 intergenic region of HSV-1 (bottom). The contributions show the inferred sequences present in the edited population and their relative proportions. Black vertical dashed lines represent cut sites (top and bottom) and the WT sequence is indicated with a “+” on the left. (b) The isolation of rHSV-1 was confirmed by immunostaining analysis of infected Vero cells for rHSV-1. Immunofluorescence analysis of infectious spots (scale bar: 10 μm, magnification 5X) showed that all infectious spots were

tdTomato⁺ (red) and HSV-1⁺ (green). (c) Confirmation of tdTomato expression by rHSV-1⁺ Vero cells. tdTomato expression (red) was confirmed by confocal imaging of infected Vero cells labeled with HSV-1 proteins (green) and counterstained with DAPI (blue) (scale bar: 10 μm, magnification 100X). Following the selection process of rHSV-1, Vero cells on cover slips were infected with rHSV-1, then washed, fixed, permeabilized, blocked and immunostained. (d) Confirmation (top) and schematic presentation of the incorporation of exogenous fragment (bottom) into UL26-UL27 intergenic region. Agarose gel electrophoresis of PCR products obtained from the UL26-UL27 intergenic region amplification of WT HSV-1 (700bp) and rHSV-1 (3796bp).

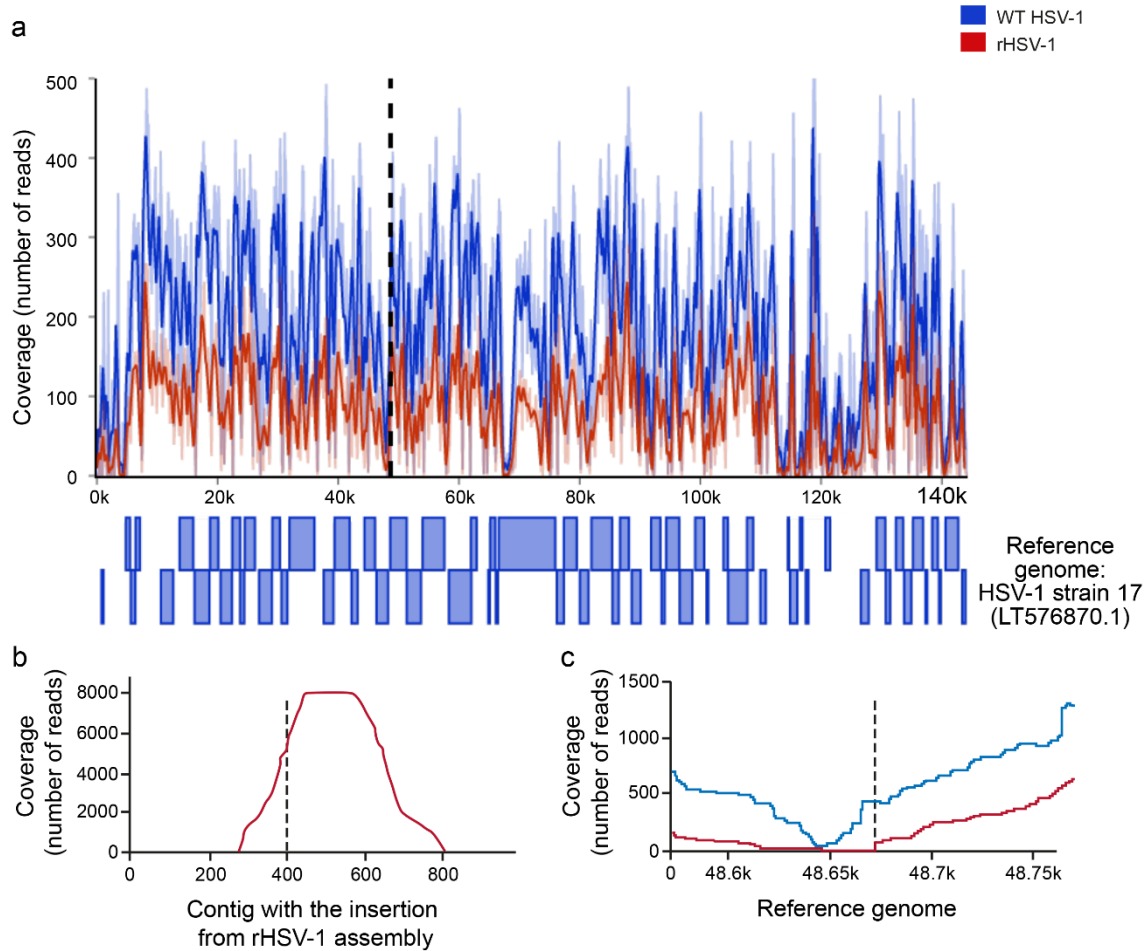


Figure 3: Sequencing depth (Coverage (number of reads)) from high-throughput sequencing of the whole genome and the insertion junction. (A) Average sequencing depth over 500 bp. after alignment of HSV-1 strain H25 (blue) and recombinant HSV-1 (rHSV-1) (red) on reference genome of HSV-1 strain 17. The dash line represents the expected insertion junction. (B) Sequencing depth of the multiplexed PCR library over the contig from rHSV-1 that contains the insertion. The PCR clearly shows that the expected junction is amplified. (C) Zoomed view from (A) to better compare the sequencing depth at the expected insertion position from HSV-1 strain 17. There are no reads from rHSV-1 that overlap the insertion point but coverage increases right after, suggesting a successful insertion.

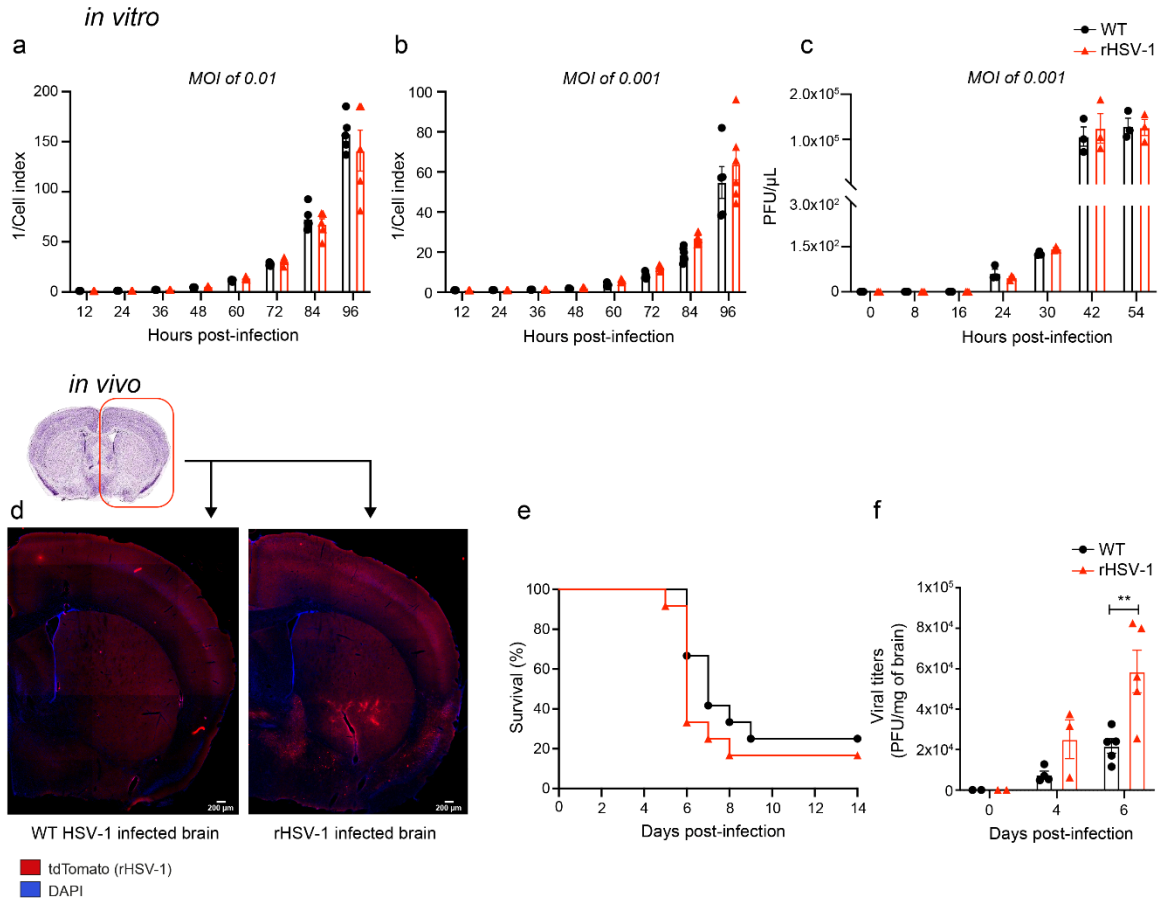


Figure 4: *In vitro* and *in vivo* replicative capacities of rHSV-1. (a, b) Replicative capacity of wild-type (WT) HSV-1 and recombinant HSV-1 (rHSV-1) were determined by real-time cell analysis (RTCA) for 96 hours. Two different multiplicity of infection (MOI) (0.01 (a) and 0.001 (b)) were used to infect Vero cells. Data are represented as 1/cell index, a dimensionless parameter that reflects changes of cellular morphology or growth rate (WT: black bars and circles, rHSV-1: red bars and triangles). (c) Replicative capacity of wild type (WT: HSV-1 strain H25) and recombinant HSV-1 (rHSV-1) virus at a MOI of 0.001, as determined by plaque assay. Vero cells were infected with both viral strains for 90 min at 37°C in a 5% CO₂ atmosphere. The viral suspensions were removed, and cells were incubated with MEM plus 2% FBS. The cell culture supernatants were collected for 54 hours. Results represent the means ± SEM for triplicate. (d) Representative fluorescent microscopy images of a WT HSV-1 (left) and rHSV-1-infected (red) (right) brain sections counterstained with DAPI (blue) on day 6 post-infection. tdTomato signal is localized in the bed nuclei of stria terminalis and medial preoptic area. (e) Survival curves of mice infected with WT HSV-1 (black line with circles) and rHSV-1 (red line and triangles). Survival

rates were analyzed using a log-rank (Mantel-Cox) test. (f) Viral titers in brain homogenates were measured by a standard plaque assay on Vero cells on days 0, 4 and 6 post-infection. The results are reported as PFU per milligram of brain homogenates and represent the means \pm SEM for 3 to 4 mice per group at each time point. Statistical analyses were performed using two-way ANOVA with Sidak's multiple comparisons test.

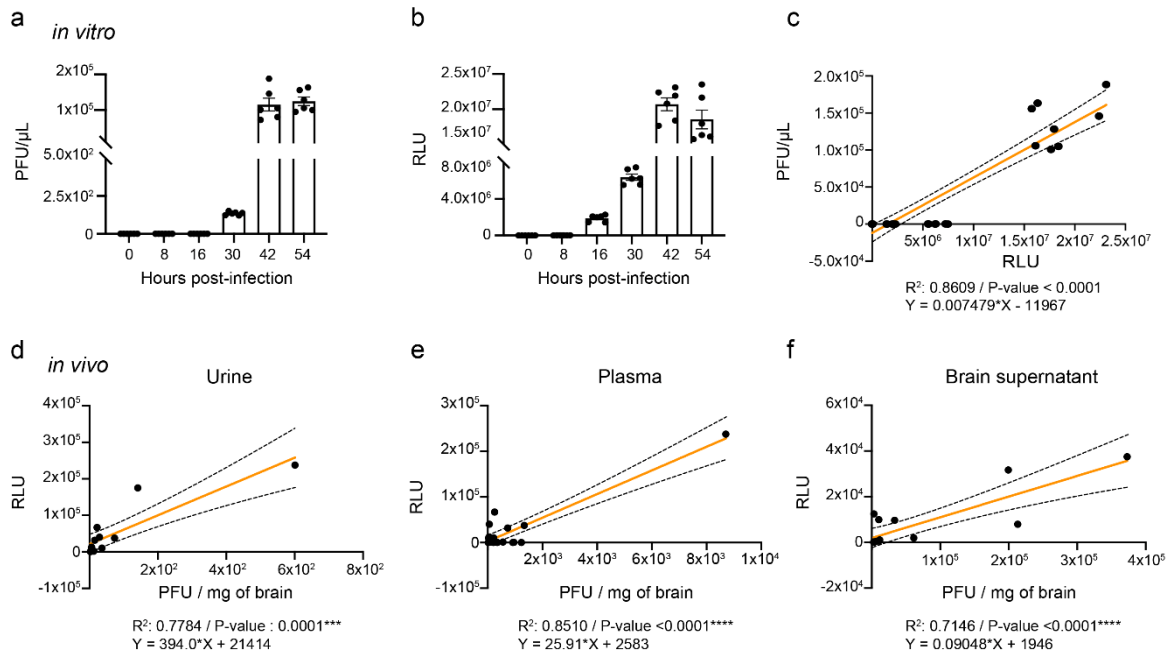


Figure 5: *In vitro* and *in vivo* relative light units (RLUs) and rHSV-1 titers correlations. (a) Replicative capacity of recombinant HSV-1 (rHSV-1) at a MOI of 0.001 as determined by plaque assay. Vero cells were infected with rHSV-1 for 90 min at 37°C in a 5% CO₂ atmosphere. The viral suspensions were removed, and cells were incubated with MEM complemented with 2% FBS. The cell culture supernatants were collected for 54 hours. (b) Gluc secretion was detected *in vitro* in supernatants. Gluc in supernatants were analyzed for relative light units (RLU). Results are presented as mean ± SEM. (c) Previously measured virus titers and corresponding RLU values were analyzed with a simple linear regression (linear regression line presented in orange). The regression equation, confidence intervals (black dashed lines), R² and P-value are shown in the graph. Six-week-old BALB/c male mice were infected intranasally with 1 500 PFU of HSV-1 strain H25 in 20 μL of minimal essential medium. Brain, blood and urine samples were collected on days 0, 4 and 6 post-infection. rHSV-1 titers in brains and Gluc activities in urine (d), plasma (e) and brain homogenate supernatants (f) were analyzed with a simple linear regression. The regression equation, confidence intervals (dashed lines), R² and P-value are shown in the graph.

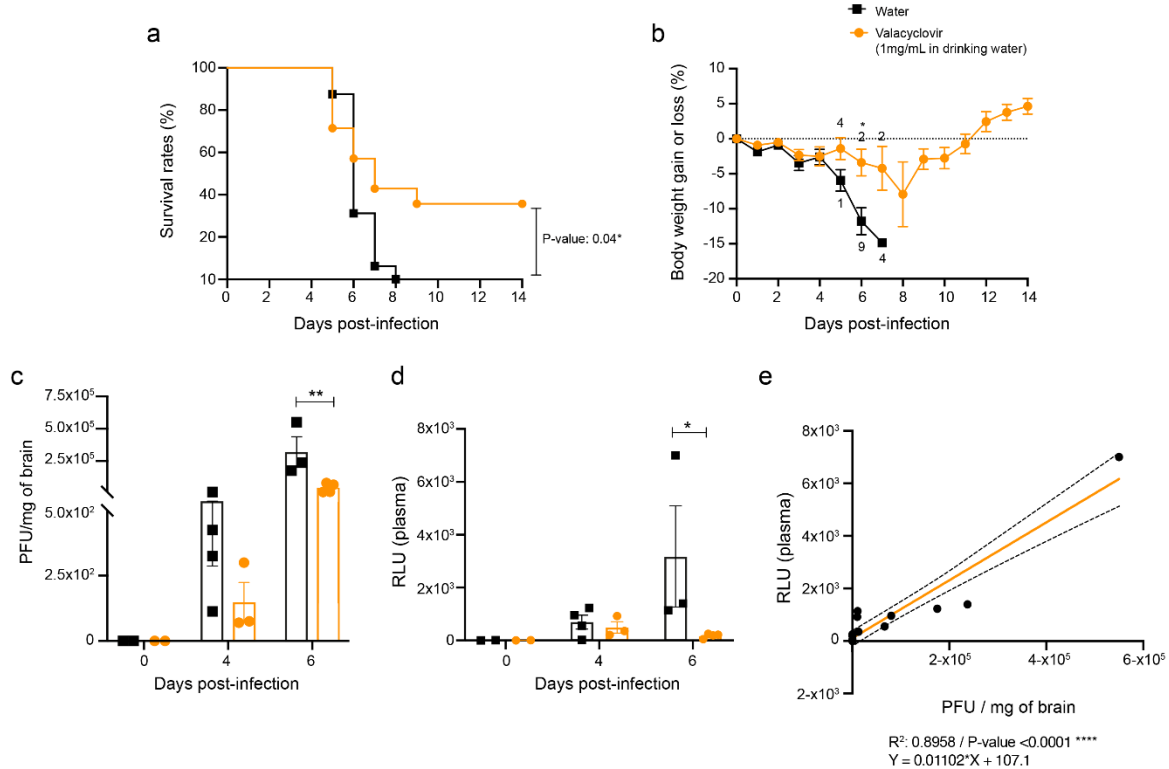


Figure 6: Luciferase activity-based rapid assessment of valacyclovir treatment against HSE.

The effect of valacyclovir (VACV) administration was studied in 6-week -old male BALB/c mice infected intranasally with 2 500 PFU of HSV-1 strain H25 in 20 μ L of minimal essential medium. Infected mice were treated with VACV (1mg/mL in drinking water) from day 3 post-infection and on. The differences in survival rates (a) and percentage of body weight changes (b) were evaluated for 14 days post-infection, using Log-Rank (Mantel–Cox) and Holm-Sidak multiple comparison t-tests, respectively. The digits along the curves (b) correspond to the numbers of dead mice on the indicated day. Viral titers in the CNS (PFU/mg of brain) (c) and luminescence (RLU) (d) in plasma samples of infected mice were measured on days 0, 4 and 6 post-infection. Results represent the means \pm SEM. Statistical differences between groups (Control group: black squares or bars; VACV: orange circles or bars) were obtained using two-way ANOVA with Sidak's multiple comparisons test. rHSV-1 titers in brains and Gluc activities in plasma (e) were analyzed with a simple linear regression. The regression equation, confidence intervals (black dashed lines), R^2 and P-value are shown in the graph.

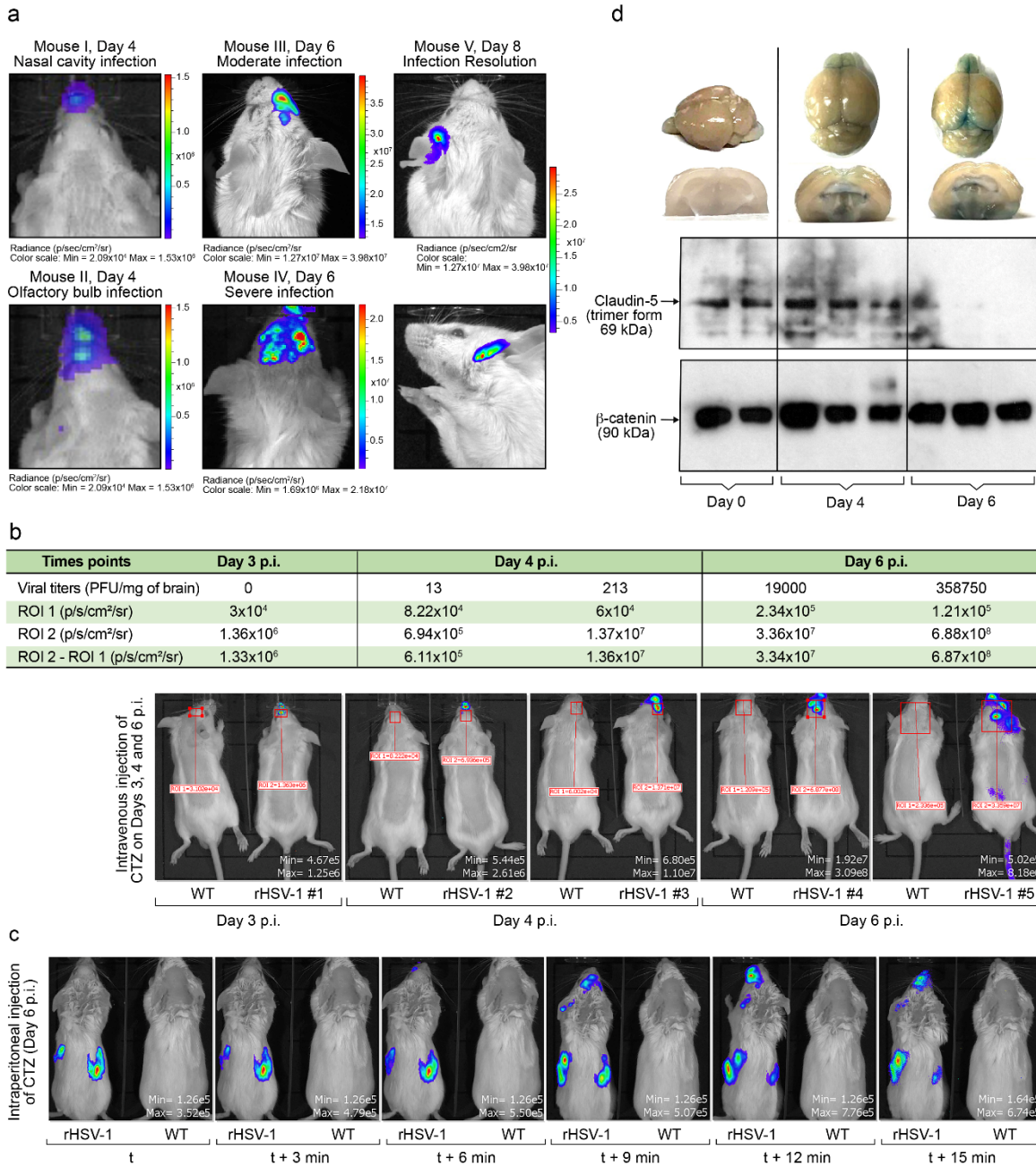


Figure 7: Study of viral dissemination in the CNS and viral titer estimation in herpes simplex virus encephalitis (HSE) by bioluminescent imaging (BLI). (a) Representative BLI images of early (Mouse I and Mouse II, Day 4), moderate (Mouse III, Day 6) and severe (Mouse IV, Day 6) HSE are shown at different time points. Two images acquired from different angles (both images captured from the same “Mouse V, Day 8”) allowed a better anatomical localization of infected areas. (b) A bioluminescence imaging series of representative mice infected with 1 500 PFU of WT HSV-1 (mice on the left side) or rHSV-1 (mice on the right side) on days 3, 4 and 6 p.i. The

bioluminescent signal is expressed in average radiance (p/s/cm²/sr). Animals infected with rHSV-1 were sacrificed and brains were removed to measure viral titers by plaque assay. The above table shows ROI-1 (negative control area, mouse infected with WT HSV-1 strain H25), ROI-2 (bioluminescent signal in the CNS, mouse infected with rHSV-1) radiance values (p/s/cm²/sr), ROI-2 - ROI-1 (normalized bioluminescent signal) and viral titers in brains for each rHSV-1 infected-mouse (c) Time-course imaging of rHSV-1-infected mice to evaluate blood-brain barrier (BBB). Following intraperitoneal CTZ injection, mice inoculated with 1 500 PFU of rHSV-1 were imaged every 3 min on day 6 post-infection. (d) BBB permeability is increased in rHSV-1-infected brains. Whole brain photos show that olfactory bulbs (on days 4 and 6 p.i.) and superior colliculus (on day 6) were intensely stained with extravasated Evans Blue dye (EBD). Coronal sections of whole brains showed EBD accumulation in thalamus and periventricular nucleus in hypothalamus of brains on days 4 and 6 p.i. (above). Western blots for claudin-5 were performed with whole brain extracts from rHSV-1-infected mouse brains. Trimer forms of Claudin-5 (69 kDa) expression were highly reduced on day 6 p.i.

Table-I: DNA oligonucleotides used to construct gRNA plasmids

gRNAs <i>In silico</i> efficiency (CHOPCHOP)	Target sequences/Target regions*	Oligo-1/ Oligo-2**
gRNA-1 / 57.04%	AGGAAAGAGGAAACAGGCCG CGG / UL26-UL27	5'- caccg AGGAAAGAGGAAAACAGGCCG-3' 5'- aaac CGGCCTGTTTCCTCTTTCCTC-3'
gRNA-2 / 61.23%	GGAATCGGCACTGACCAAGG GGG / UL26-UL27	5'- caccg GGAATCGGCACTGACCAAGG-3' 5'- aaac CCTTGGTCAGTGCCGATTCC-3'
gRNA-3 / 57.7%	GGGGAATCGGCACTGACCA AGG / UL26-UL27	5'- caccg GGGGAATCGGCACTGACCAA-3' 5'- aaac TTGGTCAGTGCCGATTCCCC-3'
gRNA-4 / 0%	GTCCATATTTGTGCTGTGCCG CGG / UL29-UL31	5'- caccg GTCCATATTTGTGCTGTGCCG-3' 5'- aaac CGGCACAGCACAAATATGGAC-3'

*gRNA sequences (20 nucleotides) followed by **PAM-3'** (red capital letters)

** 5'-caccg (Oligo-1) and 5'-aaac (Oligo-2) (red small letters) overhangs were added to gRNA oligos to clone these oligos into CRISPR vector

a

Name - gBlock EcoRI gBlocks® Gene Fragments 1369 base pairs

```

5' - CCT GCT GAA TTC TAA TGG GAG TCA AAG TTC TGT TTG CCC TGA TCT GCA TCG CTG TGG CCG AGG CCA AGC
CCA CCG AGA ACA ACG AAG ACT TCA ACA TCG TGG CCG TGG CCA GCA ACT TCG CGA CCA CGG ATC TCG ATG CTG
ACC GCG GGA AGT TGC CCG GCA AGA AGC TGC CGC TGG AGG TGC TCA AAG AGA TGG AAG CCA ATG CCC GGA AAG
CTG GCT GCA CCA GGG GCT GTC TGA TCT GCC TGT CCC ACA TCA AGT GCA CGC CCA AGA TGA AGA AGT TCA TCC
CAG GAC GCT GCC ACA CCT ACG AAG GCG ACA AAG AGT CCG CAC AGG GCG GCA TAG GCG AGG CGA TCG TCG ACA
TTC CTG AGA TTC CTG GGT TCA AGG ACT TGG AGC CCA TGG AGC AGT TCA TCG CAC AGG TCG ATC TGT GTG TGG
ACT GCA CAA CTG GCT GCC TCA AAG GGC TTG CCA ACG TGC AGT GTT CTG ACC TGC TCA AGA AGT GGC TGC CGC
AAC GCT GTG CGA CCT TTG CCA GCA AGA TCC AGG GCC AGG TGG ACA AGA TCA AGG GGG CCG GTG GTG ACG GAA
GCG GAG CTA CTA ACT TCA GCC TGC TGA AGC AGG CTG GAG ACG TGG AGG AGA ACC CTG GAC CTA TGG TGA GCA
AGG GCG AGG AGG TCA TCA AAG AGT TCA TGC GCT TCA AGG TGC GCA TGG AGG GCT CCA TGA ACG GCC ACC AGT
TCG AGA TCG AGG GCG AGG GCG AGG GCC GCC CCT ACG AGG GCA CCC AGA CCG CCA AGC TGA AGG TGA CCA AGG
GCG GCC CCC TGC CCT TCG CCT GGG ACA TCC TGT CCC CCC AGT TCA TGT ACG GCT CCA AGG CGT ACG TGA AGC
ACC CCG CCG ACA TCC CCG ATT ACA AGA AGC TGT CCT TCC CCG AGG GCT TCA AGT GGG AGC GCG TGA TGA ACT
TCG AGG ACG GCG GTC TGG TGA CCG TGA CCC AGG ACT CCT CCC TGC AGG ACG GCA CGC TGA TCT ACA AGG TGA
AGA TGC GCG GCA CCA ACT TCC CCC CCG ACG GCC CCG TAA TGC AGA AGA AGA CCA TGG GCT GGG AGG CCT CCA
CCG AGC GCC TGT ACC CCC GCG ACG GCG TGC TGA AGG GCG AGA TCC ACC AGG CCC TGA AGC TGA AGG ACG GCG
GCC ACT ACC TGG TGG AGT TCA AGA CCA TCT ACA TGG CCA AGA AGC CCG TGC . . . -3'

```

Name - gBlock NotI gBlocks® Gene Fragments 1016 base pairs

```

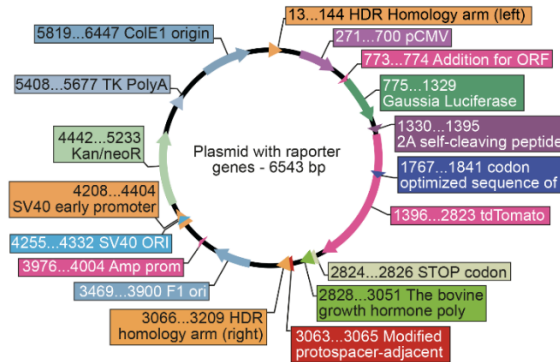
5' - CCT GCT GGT ACC GGC AGC ACC GGC AGC GGC AGC TCC GGC ACC GCC TCC TCC GAG GAC AAC AAC ATG GCC
GTC ATC AAA GAG TTC ATG CGC TTC AAG GTG CGC ATG GAG GGC TCC ATG AAC GGC CAC GAG TTC GAG ATC GAG
GGC GAG GGC GAG GGC CGC CCC TAC GAG GGC ACC CAG ACC GCC AAG CTG AAG GTG ACC AAG GGC GGC CCC CTG
CCC TTC GCC TGG GAC ATC CTG TCC CCC CAG TTC ATG TAC GGC TCC AAG GCG TAC GTG AAG CAC CCC GGC GGC
ATC CCC GAT TAC AAG AAG CTG TCC TTC CCC GAG GGC TTC AAG TGG GAG CCG GTG ATG AAC TTC GAG GAC GGC
GGT CTG GTG ACC GTG ACC CAG GAC TCC TCC CTG CAG GAC GGC ACG CTG ATC TAC AAG GTG AAG ATG CGC GGC
ACC AAC TTC CCC CCC GAC GGC CCC GTA ATG CAG AAG AAG ACC ATG GGC TGG GAG GCC TCC ACC GAG CGC CTG
TAC CCC CGC GAC GGC GTG CTG AAG GGC GAG ATC CAC CAG GCC CTG AAG CTG AAG GAG GGC GGC CAC TAC CTG
GTG GAG TTC AAG ACC ATC TAC ATG GCC AAG AAG CCC GTG CAA CTG CCC GGC TAC TAC TAC GTG GAC ACC AAG
CTG GAC ATC ACC TCC CAC AAC GAG GAC TAC ACC ATC GTG GAA CAG TAC GAG CCG TCC GAG GGC CGC CAC CAC
CTG TTC CTG TAC GGC ATG GAC GAG CTG TAC AAG TGA CTG TGC CTT CTA GTT GCC AGC CAT CTG TTG TTT GCC
CCT CCC CCG TGC CTT CCT TGA CCC TGG AAG GTG CCA CTC CCA CTG TCC TTT CCT AAT AAA ATG AGG AAA TTG
CAT CGC ATT GTC TGA GTA GGT GTC ATT CTA TTC TGG GGG GTG GGG TGG GGC AGG ACA GCA AGG GGG AGG ATT
GGG AAG ACA ATA GCA GGC ATG CTG GGG ATG CCG TGG GCT CTA TGG GCG GCC GCT GCA TGA TCT ACG TGC GTC
ACA TGC AGT AC -3'

```

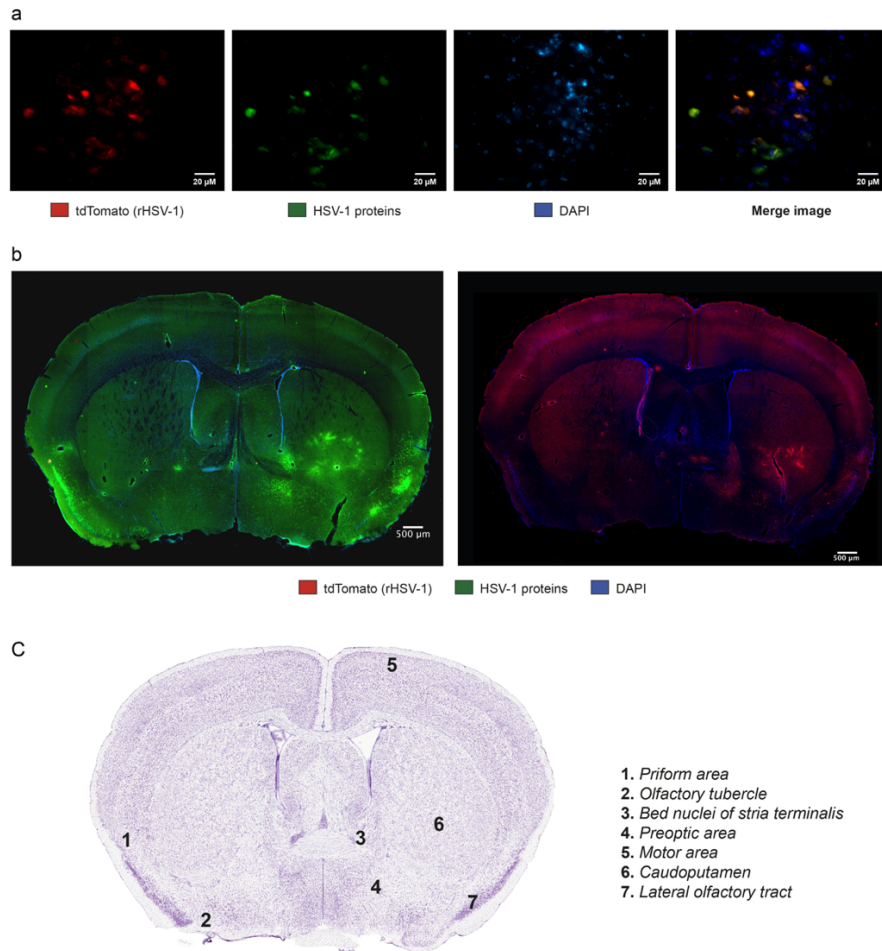
b

gBlocks Sequence Map	
<i>gBlock-1 (EcoRI) - position</i>	IDENTITY
1--13	portion with EcoRI site
14--15	Extra nucleotides for ORF correction
16--569	Gaussia Luciferase
570--635	2A Self-cleaving peptide coding sequence
636--1321	tdTomato 1
1322-1369	portion with NotI site
<i>gBlock-2 (NotI) - position</i>	IDENTITY
1--9	portion with NotI site
10--753	tdTomato 2
754--979	Bovine Growth Hormon terminator signal + PolyA sequence
987--989	Modified protospacer adjacent motif
990--1016	portion with KpnI site

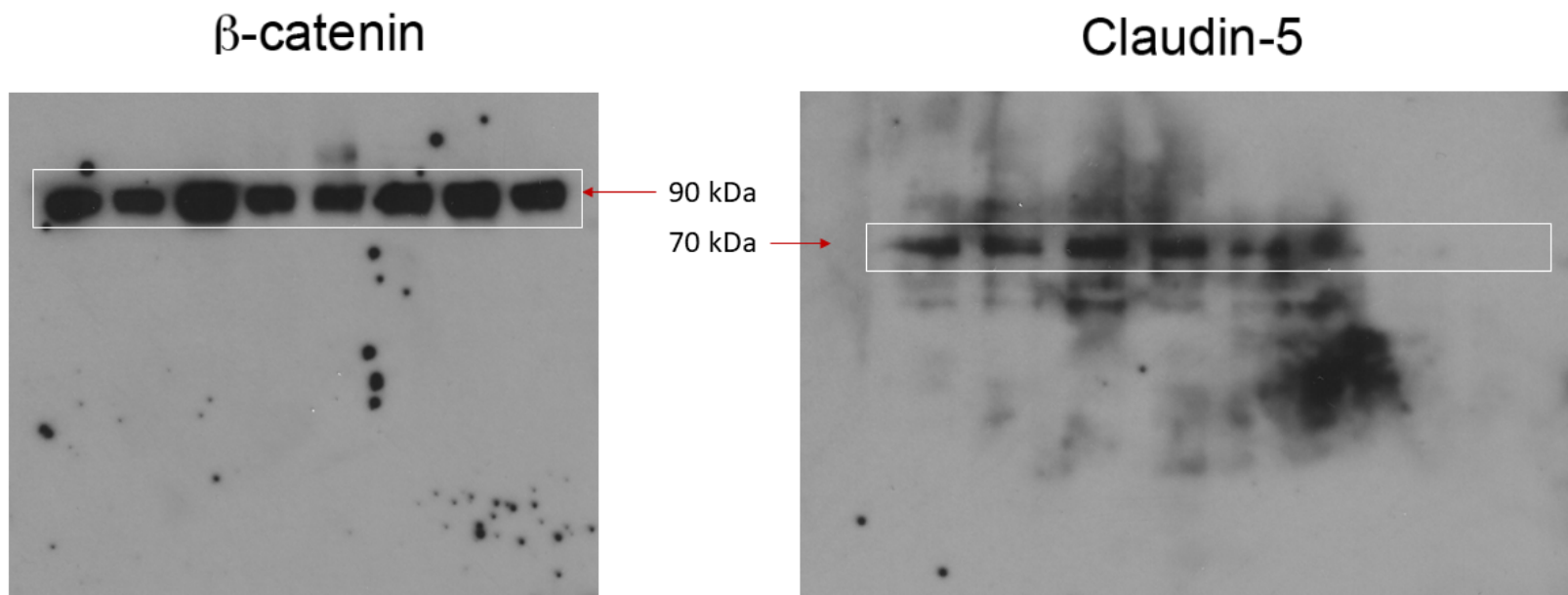
c



Supplementary Figure 1 : (a) gBlock gene fragments, (b) maps and (c) the donor plasmid map. Serial Cloner 2.6 (http://serialbasics.free.fr/Serial_Cloner.html) was used to analyze sequence data and design the donor plasmid map (c).



Supplementary Figure 2: Distribution patterns of WT HSV-1 and rHSV-1 infectious spots in the CNS are similar. (a) Colocalization of tdTomato signal (red) with HSV-1 staining (green) in rHSV-1-infected CNS cells (Scale bar = 20 μ m) (b) Representative brain sections illustrating the localization of HSV-1 proteins (upper left, green) and TdTomato expressed by rHSV-1 (pper right, red) in different regions of the brain on day 6 post-infection. Brain sections from WT HSV-1-infected mouse were immunostained with a primary polyclonal rabbit anti-HSV-1/2 antibody and a secondary Alexa 488-conjugated goat anti-rabbit antibody (green), followed by staining with DAPI (blue). rHSV-1-infected brain sections were only stained with DAPI (blue). (c) Representative coronal section (P56) of the mouse brain (lower left) showing infected regions on day 6 p.i. (Image credit: Allen Institute). HSV-1⁺ brain areas are indicated with numbers 1 to 7 (lower right).



Supplementary Figure 3: Uncropped images of scanned Western blots shown in Fig. 7(d) are provided.

Chapitre-III : L'implication de la microglie dans le contrôle de l'infection en phase précoce de l'EH expérimentale

Avant-propos

Le chapitre-III correspond à un article « **An Early Microglial Response is Needed to Efficiently Control Herpes Simplex Virus Encephalitis** » dont je suis le premier auteur et qui a été publié dans la revue « *Journal of Virology* » en 9 Novembre 2020.

PMID: 32938766 - DOI: [10.1128/JVI.01428-20](https://doi.org/10.1128/JVI.01428-20)

1. Résumé

Le rôle du mCSF (pour “Macrophage colony-stimulating factor”) et son récepteur CSF1R (pour “Colony stimulating factor 1 receptor”) au cours de l'encéphalite herpétique (EH) expérimentale a été étudié par deux approches différentes. Dans un premier temps, l'effet de l'activation de l'axe mCSF/CSF1R avant l'infection a été évalué. Pour ce faire, nous avons administré du mCSF exogène (40 µg/kg, i.p.) une fois par jour aux souris BALB/c aux jours 4 et 2 avant leur infection intranasale avec 2500 unités formant plaque (PFU) du virus hères simplex 1 (VHS-1). Le traitement avec du mCSF a significativement augmenté la survie de ces souris par rapport à celles du groupe contrôle ayant reçu de la saline (50 % contre 10 % ; $P = 0,0169$). Au J6 post-infection (p.i.), les titres viraux cérébraux ont été significativement diminués, alors que l'IFN- β a été significativement augmenté chez les souris traitées avec le mCSF comparé à celles du groupe contrôle. Le nombre de microglies CD68⁺ (un marqueur de phagocytose) a été significativement augmenté chez les souris traitées avec le mCSF par rapport au groupe contrôle. Par la suite, nous avons déplété les microglies en déplétant le CSF1R chez la souris CSF1R-loxP-CX3CR1-cre/ERT2 (fond génétique C57BL/6) à l'aide du traitement au tamoxifène. Ces souris ont ensuite été infectées par voie intranasale avec 600 000 PFU du VHS-1. Le taux de survie des souris déplétées en CSF1R (KO) était significativement inférieur à celui des souris de type sauvage (WT) (0 % vs 67 %). Les titres viraux cérébraux et les cytokines/chimiokines étaient significativement plus élevés chez les souris KO que chez les souris WT au jour 6 p.i. De plus, l'infiltration accrue de monocytes dans le cerveau des souris WT a été observée au jour 6 p.i., contrairement aux souris KO. Nos résultats suggèrent que les cellules microgliales sont essentielles pour contrôler l'EH en phase précoce de cette maladie et que l'axe mCSF/CSF1R pourrait être une cible thérapeutique pour moduler la réponse immunitaire microgliale au cours de l'EH.

2. Abstract

The role of signaling pathway through macrophage colony-stimulating factor (mCSF) and its receptor CSF1R during experimental herpes simplex virus 1 (HSV-1) encephalitis (HSE) was studied by two different approaches. Firstly, we evaluated the effect of a stimulation of mCSF/CSF1R axis before infection. Exogenous mCSF (40 µg/kg, i.p.) was administered once daily to BALB/c mice on days 4 and 2 before intranasal infection with 2,500 plaque forming units (PFUs) of HSV-1. mCSF treatment significantly increased mouse survival compared to saline (50% *versus* 10%; P=0.0169). On day 6 post-infection (p.i.), brain viral titers were significantly decreased whereas IFN-β was significantly increased in mice treated with mCSF compared to saline. The number of CD68⁺ (a phagocytosis marker) microglial cells was significantly increased in mCSF-treated mice compared to the saline group. Secondly, we conditionally depleted CSF1R on microglial cells of CSF1R-loxP-CX3CR1-cre/ERT2 mice (in a C57BL/6 background) through induction with tamoxifen. Mice were then infected intranasally with 600,000 PFUs of HSV-1. The survival rates of mice depleted in CSF1R (KO) was significantly lower than that of wild type (WT) (0% *versus* 67%). Brain viral titers and cytokines/chemokines were significantly higher in KO than in WT animals on day 6 p.i. Furthermore, an increased infiltration of monocytes into the brains of WT was seen on day 6 p.i. but not in KO mice. Our results suggest that microglial cells are essential to control HSE at early stages of the disease and that the mCSF/CSF1R axis could be a therapeutic target to regulate their response to infection.

3. Article 2

An Early Microglial Response is Needed to Efficiently Control Herpes Simplex Virus Encephalitis

Olus Uyar,^a Nataly Laflamme,^b Jocelyne Piret,^a Marie-Christine Venable,^a Julie Carbonneau,^a Karima Zarrouk,^a Serge Rivest,^b and Guy Boivin^{a,#}

^aResearch Center in Infectious Diseases, CHU de Québec- Laval University Research Center and Department of Microbiology, Faculty of Medicine, Laval University, Quebec City, QC, Canada

^bNeuroscience Laboratory, CHU de Québec- Laval University Research Center and Department of Molecular Medicine, Faculty of Medicine, Laval University, Quebec City, QC, Canada

Running Title: Microglia and herpes simplex virus encephalitis

Correspondent footnote:

Guy.Boivin@crchudequebec.ulaval.ca

Abstract word count: 250

Text word count: 6 604

Tables: 3

Figures: 10

Importance

Microglia appear to be one of the principal regulators of neuro-inflammation in the central nervous system (CNS). An increasing number of studies demonstrated that the activation of microglia could either result in beneficial or detrimental effects in different CNS disorders. Hence, the role of microglia during herpes simplex virus encephalitis (HSE) has not been fully characterized. Using experimental mouse models, we showed that an early activation of the mCSF/CSF1R axis improved the outcome of the disease possibly by inducing a proliferation of microglia. In contrast, depletion of microglia before HSV-1 infection worsened the prognosis of HSE. Thus, an early microglial response followed by a sustained infiltration of monocytes and T cells into the brain seem to be key components for a better clinical outcome. These data suggest that microglia could be a potential target for immunomodulatory strategies combined with antiviral therapy to better control the outcome of this devastating disease.

Keywords: Microglia, monocytes, mCSF/CSF1R axis, CNS infection, herpes simplex virus encephalitis

Abbreviations

ANOVA: Analysis of variance; BSA: Bovine serum albumin; CCLx: C-C chemokine ligand x; CCR: C-C chemokine receptor x; cDNA: Complementary DNA; CDx: Cluster of differentiation x; CNS: Central nervous system; Cre: Cre recombinase; CSF1R: Macrophage colony-stimulating factor 1 receptor; CX3CR1: C-X3-C motif chemokine receptor 1; DAPI: 4', 6-diamidino-2-phenylindole; ddPCR: Droplet digital polymerase chain reaction; DPBS: Dulbecco's phosphate-buffered saline; EDTA: Ethylenediaminetetraacetate; ERT2: Estrogen receptor 2; FBS: Fetal bovine serum; gD: Glycoprotein D of herpes simplex virus 1/2; HSE: Herpes simplex virus encephalitis; HSV-1: Herpes simplex virus 1; HSV-2: Herpes simplex virus 2; IFN: Interferon; IL-x: Interleukin-x; i.p. : Intraperitoneal; KO: Knock-out; KPBS: Potassium phosphate-buffered saline; loxP: Locus of X-over P1; Ly6C: Lymphocyte antigen 6 complex, locus C; Ly6G: Lymphocyte antigen 6 complex, locus G; mCSF: Macrophage colony-stimulating factor; MEM: Minimal essential medium; mRNA: Messenger ribonucleic acid; p.i. : Post-infection; PBS: Phosphate-buffered saline; PFA: Paraformaldehyde; PFU: Plaque-forming unit; PLX-5622: PLEXXIKON 5622; PRV: Pseudorabies virus; SEM: Standard error of the mean; TLCK: N α -tosyl-L-lysine chloromethyl ketone hydrochloride; Tmem-119: Transmembrane protein 119; TNF: Tumor necrosis factor; WT: Wild-type;

3.1. Introduction

Herpes simplex virus 1 (HSV-1) is ubiquitous and nearly 60% of the world population has antibodies against this virus (1-3). HSV-1 first infects innervating sensory neurons through an epithelial lesion and establishes a latent state in sensory ganglia (4, 5). HSV-1 usually causes asymptomatic infections or benign diseases but it may be also responsible for severe pathologies such as keratitis or encephalitis. Herpes simplex virus encephalitis (HSE) is the most common fatal sporadic viral encephalitis in industrialized countries. In absence of treatment, the mortality rate of patients suffering from HSE is around 70% (6-8). Intravenous acyclovir therapy decreases such important mortality rate to 20%. However, most surviving patients still suffer from significant neurologic impairments. It is now commonly assumed that neuronal damage is caused not only by viral replication but also by an exaggerated immune response in the brain (9, 10).

The mechanisms involved in the invasion of the central nervous system (CNS) by HSV-1 are not yet clearly understood. HSV-1 infiltrates the brain parenchyma and targets neurons and glial cells (11, 12). When cells of the CNS detect the presence of the virus, they induce the production of pro-inflammatory cytokines and chemokines (13). This first boost of inflammatory response is followed by the infiltration of peripheral immune cells into the CNS. This recruitment seems to be necessary to control the viral replication and spread of the infection in the brain (14, 15). However, the prolonged, overactive inflammatory response that ensued may contribute to neuropathological sequelae (16, 17).

Microglia constitute the resident immune cell population of the CNS. Microglial cells are crucial in maintaining brain homeostasis (18). These glial cells are also involved in the protection of the brain parenchyma against pathogen invasions through different mechanisms such as phagocytosis, the release of immune mediators and antigen presentation via the major histocompatibility complex II (19). The role of microglia in the context of HSV-1 infection of the CNS remains poorly explored.

The macrophage colony-stimulating factor (mCSF) is a hematopoietic cytokine that is expressed by a wide range of cells and tissues. In peripheral sites, this cytokine is involved in the development, proliferation and maintenance of mononuclear phagocytes such as

monocytes, dendritic cells and osteoclasts through the activation of a tyrosine kinase family receptor, CSF1R, also known as CD115 (20). In the CNS, the mCSF/CSF1R axis is essential for microglia survival and also mediates their proliferation, phagocytic activity and differentiation towards an anti-inflammatory phenotype (21-23). In this paper, we first evaluated the effect of an activation of mCSF/CSF1R axis by exogenous mCSF administered before intranasal infection of mice with HSV-1 on the control of viral replication and inflammation in the brain. We then examined the implication of microglia during HSE in CSF1R-loxP-CX3CR1-cre/ERT2 mice treated with tamoxifen to induce the conditional deletion of CSF1R in cells positive for CX3CR1.

Here, we report that an early response of microglia is crucial for an effective control of HSV-1 spread in the CNS and that its activation through the mCSF/CSF1R signaling pathway potentially ameliorates the outcome of HSE in murine models. Pre-treatment with mCSF increases the number of microglial cells in the CNS of mice infected with HSV-1 and could enhance their phagocytic activity. We conclude that a functional microglial surveillance is mandatory at the early stages of HSE for a better clinical outcome of this disease.

3.2. Results

Pre-treatment of mice with exogenous mCSF improves the prognosis of experimental HSE

To study the effects of a stimulation of the mCSF/CSF1R axis on the outcome of HSE, exogenous mCSF (40 µg/kg) or saline were injected i.p. once daily to BALB/c mice on days 4 and 2 prior to intranasal infection with 2,500 plaque forming units (PFUs) of HSV-1 strain H25 (Fig. 1A). Body weight losses were higher in mice treated with saline compared to mCSF on days 8, 9 and 10 post-infection (p.i.) ($P < 0.01$, $P < 0.05$ and $P < 0.01$, respectively; Fig. 1B). Mortality rate was significantly higher in mock group (91.7%) than in mCSF-treated mice (50.0%; $P = 0.0169$; Fig. 1C). Taken together, our data indicate that a pre-treatment with mCSF improves disease outcome in mice infected intranasally with HSV-1.

Stimulation of mCSF/CSF1R axis results in a better control of HSV-1 replication in the brain during HSE

The decreased mortality rates seen in mCSF-treated mice compared to the saline group could result from a reduced viral replication at the primary site of infection (nasal epithelium) or in the brain. We thus determined the infectious viral titers in tissue homogenates on days 4 and 6 p.i. for both groups of mice by a standard plaque assay on Vero cells. Viral titers were slightly lower in nasal turbinates (Fig. 1D) and brains (Fig. 1E) of mice treated with mCSF compared to those of the saline group on day 4 p.i. Interestingly, on day 6 p.i., brain viral titers were significantly reduced in mCSF-treated mice compared to control animals ($P=0.046$; Fig. 1E). A more intense labelling was also detected on brain sections of the saline group compared to mCSF-treated mice on day 6 p.i, when using an antibody directed against gD of HSV-1 (data not shown). HSV-1-labeled proteins were mainly distributed in the olfactory bulbs, hippocampus, and hypothalamic regions. These data suggest that an early activation of mCSF/CSF1R axis results in a better control of HSV-1 replication in the CNS.

mCSF stimulation increases the number of microglial cells at the early stages of HSE

We first investigated whether exogenous mCSF administration could modulate the number of microglial cells and their phagocytic phenotype by flow cytometry analyses. The numbers of $CD45^{low/int}/CD11b^+/CD115^+$ microglia were similar in mCSF and saline groups prior to the infection (Fig. 2A). However, the number of $CD115^+$ microglial cells was 2 times higher in the brains of mCSF-treated mice ($P=0.048$) on day 4 p.i. whereas it remained unchanged in the saline group. The microglia numbers in mCSF-treated mice then decreased on day 6 p.i. whereas an increase was seen in the saline group. We observed an increase in $CD68^+$ microglia population in mCSF-treated mice on day 6 compared to day 0 ($P=0.0001$) and day 4 p.i. ($P=0.001$). On day 6 p.i, the numbers of $CD68^+$ microglial cells were 2 times higher ($P=0.05$) in mCSF-treated mice compared to the saline group (Fig. 2B). To better characterize the implication of microglia, we then examined its interaction with HSV-1⁺ cells on brain sections of mCSF-treated mice on day 6 p.i. by immunofluorescence analyses. We observed that Tmem-119⁺ microglial ramifications established a direct contact with HSV-1⁺ cells to form phagocytic engulfments (Fig. 2C, left). Moreover, antibodies specific to HSV-

1 proteins, Tmem-119 and CD68 were found to be co-localized ((Fig. 2C, right). Altogether, these data suggest that mCSF stimulation triggers the proliferation of microglia and induces a phagocytic phenotype.

mCSF stimulation increases the infiltration of peripheral immune cells in the CNS

The better control of viral replication in the brain of mCSF-treated mice compared to the saline group could also result from differences in the recruitment of peripheral immune cells to the CNS. We thus evaluated their levels in the blood and brain homogenates of both groups of mice prior to (day 0) and at selected days after HSV-1 infection. We used a panel of 8 specific antibodies (see Table 1) together with a live/dead marker to distinguish different immune cell subsets by flow cytometry analyses. There was no significant difference in the blood levels of immune cells between the two groups of mice on day 0 and after HSV-1 infection (data not shown). The absolute number of CD45^{high} cells (infiltrating leukocytes) in brain homogenates was similar in both groups on day 4 p.i. (Fig. 3A). The number of CD45^{high} cells was 2.2 times higher in mCSF-treated mice compared to the saline group on day 6 (P=0.0001) and then decreased to be comparable in both groups on day 8 p.i. Ly6C⁺ monocytes/macrophages started to infiltrate the CNS on day 4 p.i. (Fig. 3B). Their levels increased significantly in mice treated with mCSF compared to saline on day 6 (P=0.0001) and then decreased to be slightly lower in the mCSF group compared to mock animals on day 8 p.i. Ly6G⁺ neutrophils also started to infiltrate the CNS of both groups of mice on day 4, reached a peak level on day 6 and markedly decreased with no significant differences between groups on day 8 p.i. (Fig. 3C). On day 4 p.i., CD3E⁺ T (Fig. 3D) and B220⁺ B lymphocytes (Fig. 3E) infiltrated the brain of HSV-1-infected animals. On day 6 p.i., the levels of infiltrating T and B cells were higher in mCSF-treated mice compared to the saline group, but the differences were not statistically significant. On day 8 p.i., the absolute numbers of infiltrating CD3E⁺ T and B220⁺ B lymphocytes were respectively 2.5 times (P=0.0218) and 1.4 times (non-significant) lower in mCSF-treated mice compared to mock animals. These data suggest that mCSF modulates the recruitment of monocytes/macrophages to the CNS during HSE, i.e., induces a higher infiltration on day 6 p.i. followed by a lower infiltration at a later time after infection (day 8 p.i.).

mCSF stimulation increases interferon- α / β mRNAs levels during HSE

To evaluate the innate antiviral response against HSV-1 infection in the CNS, we quantified interferon (IFN)- α / β mRNAs levels in brain homogenates by droplet digital PCR on days 4 and 6 after intranasal challenge with HSV-1. On day 4 p.i., the levels of IFN- α (Fig. 4A) and IFN- β (Fig. 4B) mRNAs normalized to those of the housekeeping 18S ribosomal subunit were not statistically different between both groups of mice. Interestingly, a significant increase in the normalized levels of IFN- α ($P=0.03$) and IFN- β ($P<0.001$) transcripts was observed on day 6 compared to day 4 p.i. in mice treated with mCSF. Moreover, mCSF-treated mice had significantly higher normalized levels of IFN- β ($P=0.017$) transcripts than the saline group on day 6 p.i. These data suggest that stimulation of the mCSF/CSF1R axis could allow a better control of HSV-1 replication in the CNS by increasing innate antiviral IFN- α / β responses.

mCSF administration modulates the inflammatory responses in the CNS

We also compared the levels of cytokines and chemokines in brain homogenates of mCSF- and saline-treated mice on days 4 and 6 after intranasal challenge with HSV-1. The levels of cytokines and chemokines were not significantly different between both groups on day 4 p.i. (Table 2). The levels of some cytokines were significantly increased in mCSF-treated mice compared to the saline group [IL-13 ($P=0.0249$), IFN- γ ($P=0.0079$) and IL-10 ($P=0.0053$)] on day 6 p.i. In accordance with the increased infiltration of monocytes into the brain, we also observed higher levels of CCL2 (not significant) in the CNS of mice treated with mCSF compared to the saline group. These data suggest that mCSF modulates the inflammatory responses mediated by microglia, and to some extent, by immune cells that infiltrate the brain.

Liposomal clodronate treatment does not alter survival rates and brain viral titers during HSE

In order to evaluate whether the improved survival rates of mCSF-treated mice were associated to a higher production of monocytes/macrophages by bone marrow and/or infiltration in the brain, we induced their depletion by intravenous injection of liposomal clodronate or empty liposomes (control group) to BALB/c mice on days 3 and 5 after

intranasal challenge with 1,000 PFUs of HSV-1 strain H25 (Fig. 5A). The mortality rate of mice treated with liposomal clodronate was only slightly reduced compared to that of control animals and the difference was not statistically significant ($P=0.29$; Fig. 5B). Viral titers were slightly lower in nasal turbinates of the control group compared to those of mice treated with liposomal clodronate on day 4 p.i. (Fig. 5C) whereas no significant difference was seen in the brain (Fig. 5D). Interestingly, on day 6 p.i., brain viral titers were similar in both groups despite higher viral titers in nasal turbinates of mice treated with empty liposomes compared to the liposomal clodronate group.

We then evaluated the levels of different immune cells in the blood and brain homogenates of mice treated with empty liposomes or liposomal clodronate prior to (day 0) and on days 4 and 6 after infection with HSV-1 by flow cytometry analyses. There was no significant difference in the levels of CD45^{high} leukocytes in the blood between the two groups prior to and following HSV-1 infection (Fig. 6A). On day 4 p.i., the levels of CD45^{high}/CD11b⁺/CD115⁺/Ly6C⁺ monocytes in the blood of mice treated with liposomal clodronate were significantly reduced compared to those of the control group (10% *versus* 40%; $P=0.0308$; Fig. 6B). These levels significantly decreased in the blood of mice receiving empty liposomes on day 6 p.i., which could correspond to monocytes leaving the blood to infiltrate the CNS. The numbers of other immune cells such as neutrophils, T and B cells remained unchanged in both groups of mice prior to and after HSV-1 infection (data not shown) indicating that the depletion induced by liposomal clodronate was specific to monocytes. In brain homogenates, the numbers of microglial cells and infiltrating CD45^{high} leukocytes remained unchanged in both groups throughout the infection (data not shown). Ly6C⁺ monocytes/macrophages were the only cell population for which the infiltration significantly increased in the brain of control mice during the infection (Fig. 6C) whereas the increase was non-significant in mice treated with liposomal clodronate. The levels of the two monocyte subsets Ly6C^{high} (Fig. 6D) and Ly6C^{low} (Fig. 6E) were significantly lower in the brain of mice treated with liposomal clodronate compared to the control group on days 4 ($P=0.0268$) and 6 p.i. ($P=0.0439$), respectively. Altogether, our data suggest that monocytes/macrophages that infiltrate the brain contribute to a lesser extent in the control of viral replication in the brain as compared to microglia.

Microglial depletion deteriorates the survival rates of mice infected with HSV-1

To study the effect of a microglial depletion on the outcome of HSE, we induced a conditional deletion of mCSF receptor selectively on microglia using CSF1R-loxP-CX3CR1-cre/ERT2 mice. Wild type (WT; ho-wt) and knockout (KO; ho-he) mice received tamoxifen by gavage once daily for 4 days (Fig. 7A). Three days after the last tamoxifen treatment, WT and KO mice (in a C57BL/6 background) were infected intranasally with 600,000 PFUs of HSV-1 strain H25. Both groups of mice gained body weight until day 6 p.i. (Fig. 7B). Thereafter, the body weight of KO mice markedly decreased whereas it remained stable for WT animals. All mice with a microglial depletion died from the infection compared to 33% in the WT group ($P < 0.005$; Fig. 7C).

Depletion of microglia results in a loss of control of brain viral replication during HSE

We evaluated whether the marked difference in the mortality rates seen between WT and KO mice could be due to a less efficient control of viral replication at the site of infection and/or in the brain. Viral titers in nasal turbinates were not significantly different in both groups on days 4 and 6 p.i. (Fig. 7D). In contrast, brain viral titers were higher in KO mice compared to WT animals on days 4 (non-significant) and 6 p.i. ($P = 0.035$) (Fig. 7E) which correlates with the mortality rates. These data suggest that the lack of control of HSV-1 replication in the brain of KO mice is not due to an altered mucosal response mediated by monocytes/macrophages at the site of primary infection.

Microglia response is needed at the early stages of HSV-1 infection

To better characterize our mouse model, we first evaluated the levels of monocytes in the blood and microglia in the brain of WT and KO mice three days after the last dose of tamoxifen (which corresponds to day 0) by flow cytometry analyses. Although monocytes expressed CX3CR1, no significant difference in the number of CD45^{high}/CD11b⁺/CD115⁺/Ly6C⁺ monocytes were observed in the blood of WT and KO groups (Fig. 8A). As expected, a significant decrease in the number of CD45^{low/int}/CD11b⁺/CD115⁺ microglial cells was observed in the brain of KO mice compared to that of WT counterparts ($P = 0.0028$; Fig. 8B). We then confirmed by immunofluorescence

analyses of brain sections that the number of Tmem-119⁺ cells was markedly decreased in KO compared to WT mice on day 0 (Fig. 8C). These data show that this mouse model allows a specific depletion of microglia.

On day 4 after intranasal challenge with HSV-1, the numbers of CD45^{low/int}/CD11b⁺/CD115⁺ microglia were 3.5 times higher in the CNS of WT animals compared to KO mice (P=0.0005) and decreased on day 6 p.i. to be similar in both groups (Fig. 8B). These data suggest that an efficient activation of microglia on day 4 p.i. is essential to control HSV-1 spread in the CNS.

The recruitment of peripheral immune cells to the CNS is slightly altered in microglia-depleted mice at early stages of HSE

We next evaluated whether microglial depletion affects the infiltration of peripheral immune cells in the CNS during HSE by flow cytometry analyses. The number of CD45^{high} leukocytes in the brain of WT animals was 1.7 and 2.5 times higher compared to that of the KO group on days 4 and 6 p.i., respectively, but the differences were not significant (Fig. 9A). On day 4 p.i., the recruitment of Ly6C⁺ monocytes/macrophages (Fig. 9B), Ly6G⁺ neutrophils (Fig. 9C), CD3E⁺ T lymphocytes (Fig. 9D) and B220⁺ B lymphocytes (Fig. 9E) in the brain slightly decreased (non-significant) in KO mice compared to WT animals. Thereafter, the infiltration of Ly6C⁺ monocytes/macrophages and CD3E⁺ T lymphocytes respectively increased by 3.5 and 2.8 times in the brain of WT animals compared to KO mice on day 6 p.i. In contrast, only a slight increase of all immune cell subsets was seen in the brain of KO mice. Our data suggest that microglia could be involved in the recruitment of immune cells to the CNS. The lack of microglial cells orchestrating the inflammatory response at early stages of HSE could result in a lower mobilization of leukocytes such as monocytes and T cells to the CNS of KO mice, which could contribute, to some extent, to the loss of control of viral replication.

Depletion of microglia reduces early expression of interferon α/β in the brain

As type I IFNs secretion is critical in the control of HSV-1 replication, we evaluated their expression levels in brain homogenates of WT and KO mice prior to (day 0) and on

days 4 and 6 after HSV-1 infection. The normalized levels of IFN- α (non-significant; Fig. 10A) and - β (P=0.0179; Fig. 10B) mRNAs were higher in the brain of WT mice compared to KO animals on day 4 p.i. despite high viral titers in the brain of KO mice. Moreover, both groups had similar normalized levels of type I IFNs on day 6 p.i. Our findings suggest that the absence of microglia could reduce the secretion of antiviral IFN-1 in the brain at early stages of HSE.

Depletion of microglia results in an exacerbated cytokine production in the CNS at later stages of HSE

The levels of selected cytokines and chemokines were measured in supernatants of brains harvested prior to (day 0) and on days 4 and 6 p.i. The production of cytokines/chemokines was quite similar in both groups at early stages of the infection (i.e., day 4 p.i.) (Table 3). On day 6 p.i., a significant increase in the levels of most cytokines/chemokines [IL-1 α (P=0.011), IL-1 β (P=0.0016), IL-2 (P=0.00307), IL-3 (P=0.0418), IL-5 (P=0.0011), IL-10 (P=0.0004), IL-12p40 (P=0.0027), IL-13 (P=0.032), IL-17A (P=0.0106), G-CSF (P=0.0091), IFN- γ (P=0.002), CCL2 (P=0.0002), CCL3 (P=0.028), CCL4 (P=0.0017) and CCL5 (P=0.011)] was observed in KO animals compared to WT mice, except for IL-4, IL-6 and TNF- α . These data suggest that an uncontrolled immune response occurred in mice depleted in microglia and this is associated with the increased brain viral titers seen in these mice on day 6 p.i.

3.3. Discussion

Although the role of microglia and the mCSF/CSF1R signaling pathway in the brain has been investigated in different contexts (24-27), its implication in HSV-1 infection of the CNS has not yet been widely explored. In this paper, we analyzed the role of early microglial activation during experimental HSE by following two different approaches.

Firstly, we exploited the early activation of this axis through the administration of exogenous mCSF to BALB/c mice prior to intranasal challenge with HSV-1. We choose to study the effect of mCSF pre-treatment in BALB/c mice that are susceptible to HSE to better disclose the drug benefit on the outcome of the disease. Our results showed that mCSF-

treated mice exhibited higher survival rates and a better control of brain viral titers compared to the saline group indicating that signaling through this receptor plays a beneficial role during HSE. A significant increase in microglia numbers was observed in mCSF-treated mice on day 4 p.i. suggesting that mCSF/CSF1R axis could trigger their proliferative response (28). It was already demonstrated that microglia has the ability to phagocyte infected cells and cell debris during viral infection of the CNS with West Nile virus (29). Phagocytosis was identified as one of the main defense mechanisms used by microglia against invasions of pathogens. In this context, the mCSF/CSF1R axis was shown to play an important role in the regulation of the phagocytic activity of microglial cells. Immunohistochemistry analyses revealed that Tmem-119⁺ and CD68⁺ microglia co-localized with HSV-1⁺ cells in infected regions of the CNS indicating that microglia could be involved in the viral clearance. A similar observation was previously described in mice infected with a neurotropic pseudorabies virus (PRV; another alphaherpesvirinae subfamily member) as well as in post-mortem brain tissues obtained from patients with HSE (30). We also showed that the number of CD68⁺ microglia in mice treated with mCSF was significantly increased compared to those of the saline group on day 6 p.i. This suggests that mCSF stimulation could increase phagocytic activity of microglia and contribute to the viral clearance and limit the spread of the infection in the brain. However, further studies are needed to understand the mechanism by which mCSF modulates microglial phagocytic activity.

On the other hand, the infiltration of monocytes/macrophages significantly increased in the brain of mCSF-treated mice on day 6 p.i. The higher recruitment of monocytes/macrophages into the CNS was associated with a slight increase in the CCL2 secretion in brain homogenates (31). Mice treated with mCSF also exhibited an overexpression of IFN-I transcripts on day 6 p.i. that could potentially lead to a better control of the infection. In addition to these mediators, the levels of IFN- γ , IL-10 and IL-13 were also higher in the brain of mCSF-treated mice compared to the saline group on day 6 p.i. During viral encephalitis, monocytes were shown to regulate the recruitment of effector T cells to the site of viral infection (32). In mice treated with mCSF, increased infiltration of monocytes/macrophages into the brain could thus be responsible for an higher recruitment of T cells producing IFN- γ (32). IFN- γ could also play a critical role in the viral clearance and partly contribute to the reduced viral spread (33, 34). mCSF is also known to induce a

switch towards an anti-inflammatory profile in microglia and monocytes/macrophages which produce increased levels of IL-10 (35-38). Microglia activated by IL-10 exhibit a reduction of inflammatory response together with an improved phagocytic activity (39). We also observed elevated IL-13 production in mCSF-treated group. IL-13 was suggested to be an inducer of activated microglial death, resulting in an enhancement of neuronal survival (40, 41).

To differentiate the contribution of monocytes/macrophages and microglia during HSE, we then depleted monocytes by treatment of BALB/c mice infected with HSV-1 with liposomal clodronate. Mice treated with liposomal clodronate exhibited a slightly reduced survival rate compared to controls. The drug treatment induced a significant reduction in the levels of Ly6C^{high} "inflammatory" monocytes and Ly6C^{low} "patrolling" monocytes in brain homogenates on days 4 and 6 p.i., respectively. However, this reduced infiltration of monocytes/macrophages into the CNS did not alter brain viral titers in treated animals compared to controls. We thus suggest that, at the early stages of the infection, infiltrating monocytes have a lower impact on the outcome of HSE. Previous studies from our laboratory have already demonstrated that the mortality rates of mice deficient in CCR2 in hematopoietic cells were lower than those of mice deficient in CX3CR1 in resident cells of the CNS suggesting a more important role of functional CX3CR1⁺ microglia over that of infiltrating CCR2⁺ monocytes in the control of HSE (42, 43).

Secondly, we set up an experimental protocol in CSF1R-loxP-CX3CR1-cre/ERT2 mice to induce a conditional depletion of CSF1R by tamoxifen treatment. After infection with HSV-1, the mortality rates were markedly increased in mice conditionally depleted in CSF1R compared to their WT counterparts, with no survivors on day 8 p.i. suggesting a crucial role of microglia in protecting against HSE. In line with our results, the pharmacological depletion of microglia using PLX5622 that blocks the mCSF/CSF1R signaling pathway was also shown to increase the brain viral titers and the mortality rates in mouse models of West Nile virus encephalitis, mouse hepatitis virus (a neurotropic murine coronavirus) encephalitis and PRV encephalitis, suggesting that the initiation of the innate and adaptive immune responses requires functional microglia in the CNS (30, 44, 45). The viral titers in nasal turbinates of WT and KO groups were similar suggesting that the

depletion of CSF1R did not alter the mucosal response mediated by monocytes/macrophages. These data are in accordance with unchanged monocytes levels in the blood prior to HSV-1 infection. In contrast, a significant increase in brain viral titers was observed in KO mice compared to WT animals suggesting that functional microglia is needed for an efficient control of viral replication. Another study also suggest that activated microglia constitute an early innate barrier in the olfactory bulb against vesicular stomatitis virus spread within the CNS (46). Higher brain viral titers caused by the absence of microglial cells resulted in an exacerbated inflammatory response. The decrease levels in IFN- α/β transcripts on day 4 p.i. in the brain of KO mice suggest that microglia plays a crucial role in initiating and orchestrating innate antiviral response to control HSV-1 replication in the CNS, as it has already been shown by others (47). Most cytokines/chemokines were significantly increased on day 6 p.i. in the CNS of KO mice suggesting an overzealous inflammatory response that could be detrimental.

In our study, the infiltration of monocytes/macrophages in the CNS was significantly higher in WT than in KO group on day 6 p.i. as previously demonstrated after PRV infection of mice depleted in microglia with PLX5622 (30). In contrast, an increased monocyte/macrophage infiltration was observed in the brain of microglia-depleted mice infected with coronavirus. These results suggest that infection by different viruses may differentially modulate the microglial inflammatory response to recruit peripheral immune cells to the CNS (45). Microglia could thus play a key role in the recruitment of monocytes and T cells to the brain, as shown with mice treated with mCSF. The number of microglial cells slightly increased in both groups of mice on day 4 p.i., whereas they were significantly higher in WT compared to KO mice. At later stages of HSE (day 6 p.i.), microglial cell population decreased in WT mice. Recent studies have suggested that overactivated microglia could die by apoptosis or autophagy mechanisms to limit the inflammatory response (48, 49). In contrast, there were no significant changes in the number of microglial cells in KO mice during HSV-1 infection. Altogether, these data suggest that the number of microglia could be modulated during HSE to limit the spread of HSV-1 in the CNS at early stages of the infection.

This study has some limitations. Firstly, we acknowledge that exogenous mCSF is not specific to microglia but that it also exerts some effects on monocytes that could have influenced HSV-1 infection at peripheral sites. Despite this limitation, we were able to conclude that microglial response seems more important than that of monocytes/macrophages to control viral replication in the brain during early stages of the disease. Secondly, the conditional depletion of CSF1R by administration of tamoxifen for 4 days did not result in a complete depletion of microglia. Despite this fact, a marked increase in brain viral titers and mortality rates were observed in mice depleted in microglia compared to WT animals after intranasal challenge with HSV-1.

Thus, we report that a pre-treatment of mice with mCSF led to a better outcome of experimental HSE through an early activation of microglia. mCSF stimulated the proliferation of microglia and induced a phagocytic phenotype. We suggest that the improved survival rate of mCSF-treated mice results from the combination of increased control of viral replication, enhanced phagocytosis, and anti-inflammatory response in the brain.

Furthermore, we show the importance of an early microglial response to control viral replication by using mice conditionally depleted in mCSF receptor. Higher survival rates in presence of microglia proves their pivotal role in the antiviral response. Our hypothesis is further supported by the fact that increased numbers of microglial cells induced by mCSF stimulation could lead to improved outcome during HSE. Altogether, our findings highlight the potential of mCSF/CSF1R signaling pathway in microglia as a novel target to control HSV-1 replication and inflammatory response in the brain. This axis could be used to boost early microglial responses to better control infections. However, we cannot ignore the fact that the stimulation of mCSF/CSF1R axis could be detrimental in some diseases such as cancers (26). The role of microglia in the control of HSV-1 infection of the CNS and strategies that could trigger microglial proliferation at early stages of HSE should be further studied to develop immunomodulatory strategies that could be combined with antivirals for the treatment of this disease.

3.4. Materials and Methods

Animals

Four- to six-week old BALB/c male mice were purchased from Charles River Canada. Wild type (WT; i.e., CSF1R-loxP mice X C57BL/6 mice; ho-wt) and knockout (KO; i.e., CSF1R-loxP mice X CX3CR1-cre/ERT2 mice; ho-he) mouse colonies have been established and maintained in a C57BL/6 background at our research center. Animals were acclimated to standard laboratory conditions for one week and housed 3 to 4 per cage. Targeted environmental conditions (temperature, humidity) in the housing room were $22\pm 3^{\circ}\text{C}$ and $50\pm 20\%$ relative humidity. The light/dark cycle was 12 hours (on at 7:15 and off at 19:15). 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 (protocols no. 2013078 and 2017072).

Pre-treatment of BALB/c mice with mCSF prior to HSV-1 infection

Groups of BALB/c male mice (n=12 per group) were injected i.p. with mCSF (R&D Systems) diluted in saline (40 $\mu\text{g}/\text{kg}$) or vehicle on days 4 and 2 prior to intranasal infection with 2,500 PFUs of clinical HSV-1 strain H25 (described elsewhere (50)) in 20 μL of minimal essential medium (MEM; Thermo Fisher Scientific) (Fig. 1A). Mice were monitored for sickness signs and mortality as described below. Subsets of mice (n=4-5 per group and per time point) were sacrificed prior to infection (day 0) and at selected times p.i. for the determination of viral titers in nasal turbinates and brain, levels of immune cells in the blood, infiltration of peripheral immune cells into the brain, IFN- α and - β mRNA transcripts and cytokine/chemokine synthesis in brain homogenates as well as for immunohistochemistry analyses on brain sections as described below.

Depletion of circulating monocytes with liposomal clodronate

Six-week old BALB/c male mice were infected intranasally with 1,000 PFUs of HSV-1 strain H25 in 20 μL MEM. Groups of mice (n=12 per group) received 200 μL of liposomal clodronate or empty liposomes in phosphate-buffered saline (PBS) (~5 mg/mL) by intravenous injection in the tail vein once daily on days 3 and 5 p.i. (Fig. 5A). Mice were

monitored for HSE-related signs and mortality as described below. Subsets of mice (n=3-5 per group and per time point) were sacrificed prior to (day 0) and at selected times p.i. for the determination of viral titers in nasal turbinates and brain, levels of immune cells in the blood and infiltration of peripheral immune cells in the brain as described below.

Infection of CSF1R-loxP-CX3CR1-cre/ERT2 mice with HSV-1

CSF1R-loxP-CX3CR1-cre/ERT2 mice (described elsewhere (51)) have a tamoxifen-inducible CRE recombinase activity leading to the deletion of *CSF1R* gene in CX3CR1⁺ cells. WT and KO male mice were treated with 5 mg of tamoxifen dissolved in 100 μ L corn oil by gavage once daily for 4 days (Fig. 7A). Three days later, mice were infected with 600,000 PFUs of HSV-1 strain H25 in 20 μ L MEM by the intranasal route. Subsets of WT and KO mice (n=4-5 per group and per time point) were sacrificed prior to infection (day 0) and at selected times p.i. for the determination of viral titers in nasal turbinates and brain, levels of immune cells in the blood, infiltration of peripheral immune cells in the brain, IFN- α/β mRNA transcripts and cytokine/chemokine synthesis in brain homogenates as well as for immunohistochemistry studies on brain sections as described below.

Evaluation of clinical signs of HSE

Mice were monitored for HSE-related signs, namely, ruffled fur, ocular swelling, shaking movements, swollen forehead, body weight loss and mortality twice daily for 14 days. Animals were sacrificed when a body weight loss equal to or greater than 20% or a combination of two other obvious sickness signs were observed.

Infectious viral titer measurements

Mice were anaesthetized by i.p. injection of a mixture of ketamine/xylazine (at doses of 90 mg/mL and 10 mg/mL, respectively) and sacrificed by intracardiac perfusion with cold 0.9% saline. Nasal turbinates and brains were harvested and homogenized in 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). A standard plaque assay on African green monkey kidney (Vero) cells (ATCC[®] CCL-81[™]; American Type Culture Collection) was used to

determine viral titers in homogenates of nasal turbinates and brains. The numbers of PFUs were determined as described elsewhere (42).

Flow cytometry analyses of blood samples.

Blood samples (~150 μ L) were withdrawn from the facial vein of mice. Samples were collected in EDTA-coated tubes (Thermo Fisher Scientific) to prevent coagulation. A volume of 100 μ L of blood sample was incubated with 5 mL of Red Blood cell Lysis Buffer 1X (BioLegend) at room temperature for 20 min. After a single washing step, cell suspensions were incubated with BD Horizon™ Fixable Viability Stain 510 (FVS510; BD Biosciences) followed by a blocking step with purified rat anti-mouse CD16/CD32 (Mouse BD Fc Block™ 2.4G2; BD Biosciences) both on ice for 30 min. After a washing step, immune cells were labeled with an antibody pool (see Table 1) at 4°C for 30 min. Then, cells were washed once, permeabilized with eBioscience™ Foxp3/Transcription Factor Staining kit (Thermo Fisher Scientific) and incubated with CD115 antibody. Labeled cells were fixed, washed, and resuspended in Dulbecco's PBS (DPBS; Wisent Bio Products). Finally, a volume of 50 μ L of Precision Count Beads™ (BioLegend) was added to each sample in order to obtain an absolute cell count number. Flow cytometry analyses and data acquisition were performed using a BD SORP LSR II (BD Biosciences) and BD FACS Diva software, respectively.

Flow cytometry analyses of brain homogenates

Mice were deeply anaesthetized as described above and perfused intracardially with ice-cold DPBS without Ca^{2+} and Mg^{2+} . Brains were harvested, homogenized and incubated in DPBS containing Liberase™ TL, N_{α} -Tosyl-L-lysine chloromethyl ketone hydrochloride (TLCK) (both from Sigma-Aldrich) and DNase-I (Biorbyt) for 1 h at 37°C. Homogenates were then filtered through a 70 μ m cell strainer (BD Biosciences). After a washing step, cells were centrifuged at 600 \times g for 40 min in a Percoll gradient (37% and 80%) (GE Healthcare). The cell ring at the interphase was collected, centrifuged at 300 \times g for 10 min and washed twice with DPBS containing 2% fetal bovine serum (FBS; Wisent). Cells were incubated with CD16/CD32 (Mouse BD Fc Block™ 2.4G2) and then with FVS510 both on ice for 30 min. Cells were incubated with a pool of antibodies (see Table 1) for 30 min. In some experiments, cells were washed once, permeabilized with eBioscience™

Foxp3/Transcription Factor Staining kit and incubated with CD115 and CD68 antibodies. Labeled cells were fixed, washed and resuspended in DPBS. Finally, a volume of 50 μ L of Precision Count Beads™ was added to each sample. Flow cytometry analyses and data acquisition were performed using a BD SORP LSR II and BD FACSDiva software, respectively.

Immunofluorescence studies

Mice were sacrificed by intracardiac perfusion with cold 0.9% saline followed by a 4% paraformaldehyde solution (pH 7.4) at 4°C. Fixed brains were cut in 25- μ m coronal sections on dry ice using a microtome (Reichert-Jung, Cambridge Instruments Company). Free-floating sections were washed 3 times in potassium PBS (KPBS) for 15 min and incubated in KPBS containing 2% bovine serum albumin (BSA) and 1% Triton X-100 (both from Sigma-Aldrich) for 30 min. Sections were incubated with primary antibodies (see Table 1) half-diluted in the same buffer solution at 4°C overnight. Following incubation, sections were rinsed 3 times in KPBS for 10 min, followed by an incubation with fluorochrome-conjugated secondary antibodies at room temperature for 90 min. Finally, nuclear staining was performed using DAPI (diluted to 0.0002%; Molecular Probes) for 10 min. Sections were then rinsed 3 times in KPBS for 10 min before being mounted onto SuperFrost slides (Fisher Scientific) and coverslipped with Fluoromount-G (Electron Microscopy Sciences). Confocal fluorescence microscopy images were captured using a Confocal Quorum WaveFX spinning disk confocal microscope (Quorum Technologies) equipped with a Hamamatsu ImageEM camera (Hamamatsu Corporation). Images were acquired using the Volocity 4 software (Perkin Elmer).

Quantification of IFN- α /- β mRNAs by droplet digital PCR (ddPCR)

Total RNA was extracted from 1 mL of Trizol/brain homogenate mixtures (900 μ L: 100 μ L) using Direct-zol RNA MiniPrep Plus Kit (Zymo Research Corporation) as described in the manufacturer's instructions. The total RNA concentrations in the extracts measured using a NanoDrop™ One Microvolume Spectrophotometer (Thermo Scientific) were adjusted to 80 ng per total reaction mix (30 μ L) to generate cDNAs using random hexamers and the SuperScript™ IV polymerase (both from Invitrogen). RT reaction was performed as

described in the manufacturer's instructions. For the PCR step, a volume of 5 μ L of cDNAs was added to 20 μ L of reaction mix (QX200™ ddPCR™ EvaGreen® Supermix; Bio-Rad Laboratories) containing primers specific to IFN- α , IFN- β and 18S genes (available upon request). PCR reactions were performed in droplets produced with the QX200 droplet generator (Bio-Rad Laboratories). Droplet-partitioned samples were then transferred to a 96-well plate, sealed and cycled in a C1000 deep-well thermocycler (Bio-Rad Laboratories) under the following cycling protocol: 95°C for 5 min (DNA polymerase activation), 40 cycles at 95°C for 30 s and 57.8°C for 1 min, post-cycling steps at 4°C for 5 min and then at 98°C for 10 min (enzyme inactivation) and an infinite hold at 12°C. The plate was then read in the FAM channel of the QX200 droplet reader (Bio-Rad Laboratories). Data were analyzed using the QuantaSoft software (Version 1.7.4; Bio-Rad Laboratories). The numbers of mRNA copies of IFN- α/β were normalized to those of the housekeeping 18S ribosomal subunit in each sample.

Cytokine and chemokine level measurements

Brain homogenates were centrifuged at 10,000 \times g for 10 min at 4°C. Levels of cytokines and chemokines were determined in supernatants by magnetic bead-based immunoassays using the Bio-Plex mouse cytokine group I plex assay (Bio-Rad Laboratories) according to the manufacturer's instructions. Data were analyzed using a Bio-Plex system equipped with the BioPlex Manager Software v6.0.

Statistical analyses

All statistical analyses were performed using GraphPad Prism software program v8 (GraphPad Software) after excluding outliers by Grubb's test. A P value <0.05 was considered statistically significant. All data are presented as mean \pm standard error of the mean (SEM). Survival rates were analyzed by log-rank Mantel-Cox test. All other data were analyzed by two-way analysis of variance (ANOVA) followed by Tukey HSD Post-Hoc test.

Acknowledgments

This study was supported by two Foundation Grants from the Canadian Institutes of Health Research (grant no. 148361 to G.B. and grant no. 143279 to S.R.). G.B. is the holder

of the Canada research chair (CRC) on emerging viruses and antiviral resistance and S.R. holds a CRC in Neuroimmunology. The authors would like to thank Dr Alexandre Brunet from Imaging and Cytometry platforms for assistance in acquisition of flow cytometry data, Julie-Christine Levesque from Bioimaging and Luminex technology platforms for assistance in Bio-Plex system and Bio-Plex manager software and Nathalie Goyette from infectious diseases research center for the development of droplet digital PCR method for the quantification of IFN- α / β mRNAs; all located at the CHU de Québec- Laval University Research Center.

Author's contributions

O.U., J.P., S.R. and G.B. conceived and designed the study; O.U., N.L., M.-C.V., J.C. and K.Z. performed research; O.U. and N.L. analyzed data; O.U., J.P., N.L., G.B. and S.R. wrote the paper.

3.5. References

1. Whitley RJ, Roizman B. 2001. Herpes simplex virus infections. *Lancet* 357:1513-8.
2. Wald A, Corey L. 2007. HSV: persistence in the population: epidemiology, transmission. p 656-674. In Arvin A, Campadelli-Fiume G, Mocarski E, Moore PS, Roizman B, Whitley R, Yamanishi K (ed), *Human Herpesviruses: Biology, Therapy, and Immunoprophylaxis*. Cambridge University Press.
3. Bradley H, Markowitz LE, Gibson T, McQuillan GM. 2014. Seroprevalence of herpes simplex virus types 1 and 2--United States, 1999-2010. *J Infect Dis* 209:325-33.
4. Steiner I, Benninger F. 2013. Update on herpes virus infections of the nervous system. *Curr Neurol Neurosci Rep* 13:414.
5. Whitley RJ. 2015. Herpes simplex virus infections of the central nervous system. *Continuum (Minneapolis, Minn)* 21:1704-13.
6. Whitley RJ. 2006. Herpes simplex encephalitis: adolescents and adults. *Antiviral Res* 71:141-8.
7. Rozenberg F, Deback C, Agut H. 2011. Herpes simplex encephalitis : from virus to therapy. *Infect Disord Drug Targets* 11:235-50.
8. Kennedy PG, Steiner I. 2013. Recent issues in herpes simplex encephalitis. *J Neurovirol* 19:346-50.
9. Piret J, Boivin G. 2020. Immunomodulatory strategies in herpes simplex virus encephalitis. *Clin Microbiol Rev* 33:e00105-19.
10. Whitley R, Baines J. 2018. Clinical management of herpes simplex virus infections: past, present, and future. *F1000Res* 7:1726.
11. DeBiasi RL, Kleinschmidt-DeMasters BK, Richardson-Burns S, Tyler KL. 2002. Central nervous system apoptosis in human herpes simplex virus and cytomegalovirus encephalitis. *J Infect Dis* 186:1547-57.
12. Lokensgard JR, Cheeran MC, Hu S, Gekker G, Peterson PK. 2002. Glial cell responses to herpesvirus infections: role in defense and immunopathogenesis. *J Infect Dis* 186 Suppl 2:S171-9.

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.
14. Uyangaa E, Choi JY, Patil AM, Hossain FMA, Park SO, Kim B, Kim K, Eo SK. 2018. Dual TLR2/9 recognition of herpes simplex virus infection is required for recruitment and activation of monocytes and NK cells and restriction of viral dissemination to the central nervous system. *Front Immunol* 9:905.
15. 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.
16. 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.
17. 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.
18. Sheridan GK, Murphy KJ. 2013. Neuron-glia crosstalk in health and disease: fractalkine and CX3CR1 take centre stage. *Open Biol* 3:130181.
19. Chen Z, Zhong D, Li G. 2019. The role of microglia in viral encephalitis: a review. *J Neuroinflammation* 16:76.
20. Pixley FJ, Stanley ER. 2004. CSF-1 regulation of the wandering macrophage: complexity in action. *Trends Cell Biol* 14:628-38.
21. Pons V, Rivest S. 2018. New therapeutic avenues of mCSF for brain diseases and injuries. *Front Cell Neurosci* 12:499.
22. Chitu V, Gokhan S, Nandi S, Mehler MF, Stanley ER. 2016. Emerging roles for CSF-1 receptor and its ligands in the nervous system. *Trends Neurosci* 39:378-393.
23. El-Gamal MI, Al-Ameen SK, Al-Koumi DM, Hamad MG, Jalal NA, Oh CH. 2018. Recent advances of colony-stimulating factor-1 receptor (CSF-1R) kinase and its inhibitors. *J Med Chem* 61:5450-5466.

24. Olmos-Alonso A, Schettters ST, Sri S, Askew K, Mancuso R, Vargas-Caballero M, Holscher C, Perry VH, Gomez-Nicola D. 2016. Pharmacological targeting of CSF1R inhibits microglial proliferation and prevents the progression of Alzheimer's-like pathology. *Brain* 139:891-907.
25. Gerber YN, Saint-Martin GP, Bringuier CM, Bartolami S, Goze-Bac C, Noristani HN, Perrin FE. 2018. CSF1R inhibition reduces microglia proliferation, promotes tissue preservation and improves motor recovery after spinal cord injury. *Front Cell Neurosci* 12:368.
26. Cannarile MA, Weisser M, Jacob W, Jegg AM, Ries CH, Ruttinger D. 2017. Colony-stimulating factor 1 receptor (CSF1R) inhibitors in cancer therapy. *J Immunother Cancer* 5:53.
27. Hatton CF, Duncan CJA. 2019. Microglia Are Essential to Protective Antiviral Immunity: Lessons From Mouse Models of Viral Encephalitis. *Front Immunol* 10:2656.
28. Mitrasinovic OM, Murphy GM, Jr. 2003. Microglial overexpression of the M-CSF receptor augments phagocytosis of opsonized Abeta. *Neurobiol Aging* 24:807-15.
29. Quick ED, Leser JS, Clarke P, Tyler KL. 2014. Activation of intrinsic immune responses and microglial phagocytosis in an ex vivo spinal cord slice culture model of West Nile virus infection. *J Virol* 88:13005-14.
30. Fekete R, Cserep C, Lenart N, Toth K, Orsolits B, Martinecz B, Mehes E, Szabo B, Nemeth V, Gonci B, Sperlagh B, Boldogkoi Z, Kittel A, Baranyi M, Ferenczi S, Kovacs K, Szalay G, Rozsa B, Webb C, Kovacs GG, Hortobagyi T, West BL, Kornyei Z, Denes A. 2018. Microglia control the spread of neurotropic virus infection via P2Y12 signalling and recruit monocytes through P2Y12-independent mechanisms. *Acta Neuropathol* 136:461-482.
31. Howe CL, LaFrance-Corey RG, Goddery EN, Johnson RK, Mirchia K. 2017. Neuronal CCL2 expression drives inflammatory monocyte infiltration into the brain during acute virus infection. *J Neuroinflammation* 14:238.
32. Savarin C, Stohlman SA, Atkinson R, Ransohoff RM, Bergmann CC. 2010. Monocytes regulate T cell migration through the glia limitans during acute viral encephalitis. *J Virol* 84:4878-88.

33. Smith PM, Wolcott RM, Chervenak R, Jennings SR. 1994. Control of acute cutaneous herpes simplex virus infection: T cell-mediated viral clearance is dependent upon interferon-gamma (IFN-gamma). *Virology* 202:76-88.
34. Iijima N, Mattei LM, Iwasaki A. 2011. Recruited inflammatory monocytes stimulate antiviral Th1 immunity in infected tissue. *Proc Natl Acad Sci U S A* 108:284-9.
35. Ushach I, Zlotnik A. 2016. Biological role of granulocyte macrophage colony-stimulating factor (GM-CSF) and macrophage colony-stimulating factor (M-CSF) on cells of the myeloid lineage. *J Leukoc Biol* 100:481-9.
36. Hashimoto S, Yamada M, Motoyoshi K, Akagawa KS. 1997. Enhancement of macrophage colony-stimulating factor-induced growth and differentiation of human monocytes by interleukin-10. *Blood* 89:315-21.
37. Nolan Y, Maher FO, Martin DS, Clarke RM, Brady MT, Bolton AE, Mills KH, Lynch MA. 2005. Role of interleukin-4 in regulation of age-related inflammatory changes in the hippocampus. *J Biol Chem* 280:9354-62.
38. Fenn AM, Henry CJ, Huang Y, Dugan A, Godbout JP. 2012. Lipopolysaccharide-induced interleukin (IL)-4 receptor-alpha expression and corresponding sensitivity to the M2 promoting effects of IL-4 are impaired in microglia of aged mice. *Brain Behav Immun* 26:766-77.
39. Fu R, Shen Q, Xu P, Luo JJ, Tang Y. 2014. Phagocytosis of microglia in the central nervous system diseases. *Mol Neurobiol* 49:1422-34.
40. Shin WH, Lee DY, Park KW, Kim SU, Yang MS, Joe EH, Jin BK. 2004. Microglia expressing interleukin-13 undergo cell death and contribute to neuronal survival in vivo. *Glia* 46:142-52.
41. Yang MS, Ji KA, Jeon SB, Jin BK, Kim SU, Jou I, Joe E. 2006. Interleukin-13 enhances cyclooxygenase-2 expression in activated rat brain microglia: implications for death of activated microglia. *J Immunol* 177:1323-9.
42. Menasria R, Canivet C, Piret J, Gosselin J, Boivin G. 2017. Protective role of CX3CR1 signalling in resident cells of the central nervous system during experimental herpes simplex virus encephalitis. *J Gen Virol* 98:447-460.

43. 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.
44. Seitz S, Clarke P, Tyler KL. 2018. Pharmacologic depletion of microglia increases viral load in the brain and enhances mortality in murine models of flavivirus-induced encephalitis. *J Virol* 92.
45. Wheeler DL, Sariol A, Meyerholz DK, Perlman S. 2018. Microglia are required for protection against lethal coronavirus encephalitis in mice. *J Clin Invest* 128:931-943.
46. Chhatbar C, Detje CN, Grabski E, Borst K, Spanier J, Ghita L, Elliott DA, Jordao MJC, Mueller N, Sutton J, Prajeeth CK, Gudi V, Klein MA, Prinz M, Bradke F, Stangel M, Kalinke U. 2018. Type I Interferon Receptor Signaling of Neurons and Astrocytes Regulates Microglia Activation during Viral Encephalitis. *Cell Rep* 25:118-129 e4.
47. Reinert LS, Lopusna K, Winther H, Sun C, Thomsen MK, Nandakumar R, Mogensen TH, Meyer M, Vaegter C, Nyengaard JR, Fitzgerald KA, Paludan SR. 2016. Sensing of HSV-1 by the cGAS-STING pathway in microglia orchestrates antiviral defence in the CNS. *Nat Commun* 7:13348.
48. Han J, Zhu K, Zhang XM, Harris RA. 2019. Enforced microglial depletion and repopulation as a promising strategy for the treatment of neurological disorders. *Glia* 67:217-231.
49. Askew K, Li K, Olmos-Alonso A, Garcia-Moreno F, Liang Y, Richardson P, Tipton T, Chapman MA, Riecken K, Beccari S, Sierra A, Molnar Z, Cragg MS, Garaschuk O, Perry VH, Gomez-Nicola D. 2017. Coupled proliferation and apoptosis maintain the rapid turnover of microglia in the adult brain. *Cell Rep* 18:391-405.
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.
51. Laflamme N, Cisbani G, Prefontaine P, Srour Y, Bernier J, St-Pierre MK, Tremblay ME, Rivest S. 2018. mCSF-induced microglial activation prevents myelin loss and promotes its repair in a mouse model of multiple sclerosis. *Front Cell Neurosci* 12:178.

Figures:

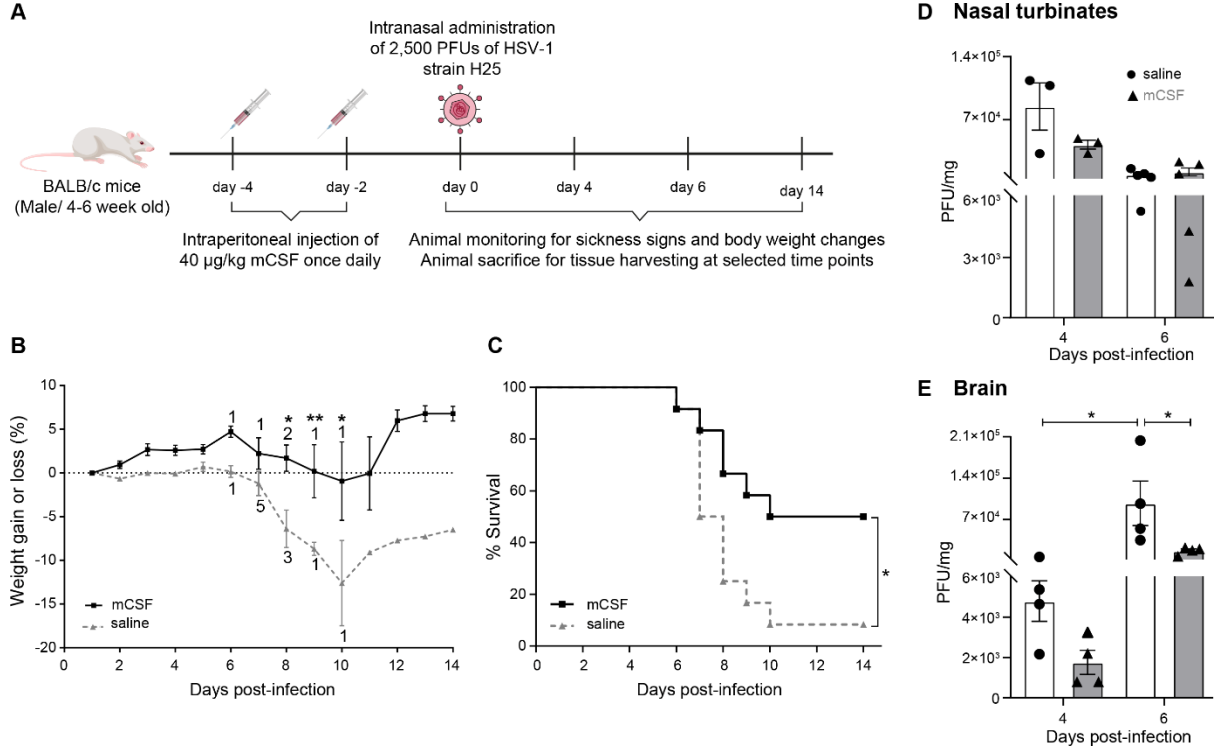


FIG 1 Early activation of mCSF/CSF1R axis improves survival rate and control of viral replication during HSE.

A) Four- to six-week old BALB/c male mice (n=12 mice per group) received i.p. injections of mCSF solution (40 µg/kg) or saline (vehicle) once daily on days 4 and 2 before intranasal infection with 2,500 PFUs of HSV-1 strain H25 in 20 µL minimal essential medium. B) Percentage of body weight gain or loss of mCSF- (▲) and saline-treated (●) mice. The digits correspond to the numbers of dead mice on the indicated day for each group. C) Survival curves of mCSF- and saline-treated mice. Survival rates were analysed using a log-rank (Mantel-Cox) test. D and E) Viral titers in homogenates of nasal turbinates (D) and brain (E) were measured by a standard plaque assay on Vero cells on days 4 and 6 post-infection. Results are reported as PFUs/mg of nasal turbinates or brain homogenates and represent the mean ± SEM of 3 to 5 mice per group at each time point. Statistical analyses were performed using a two-way analysis of variance (ANOVA) with Tukey HSD post-hoc test. Statistically significant results are indicated as follows: *, P<0.05; **, P<0.01.

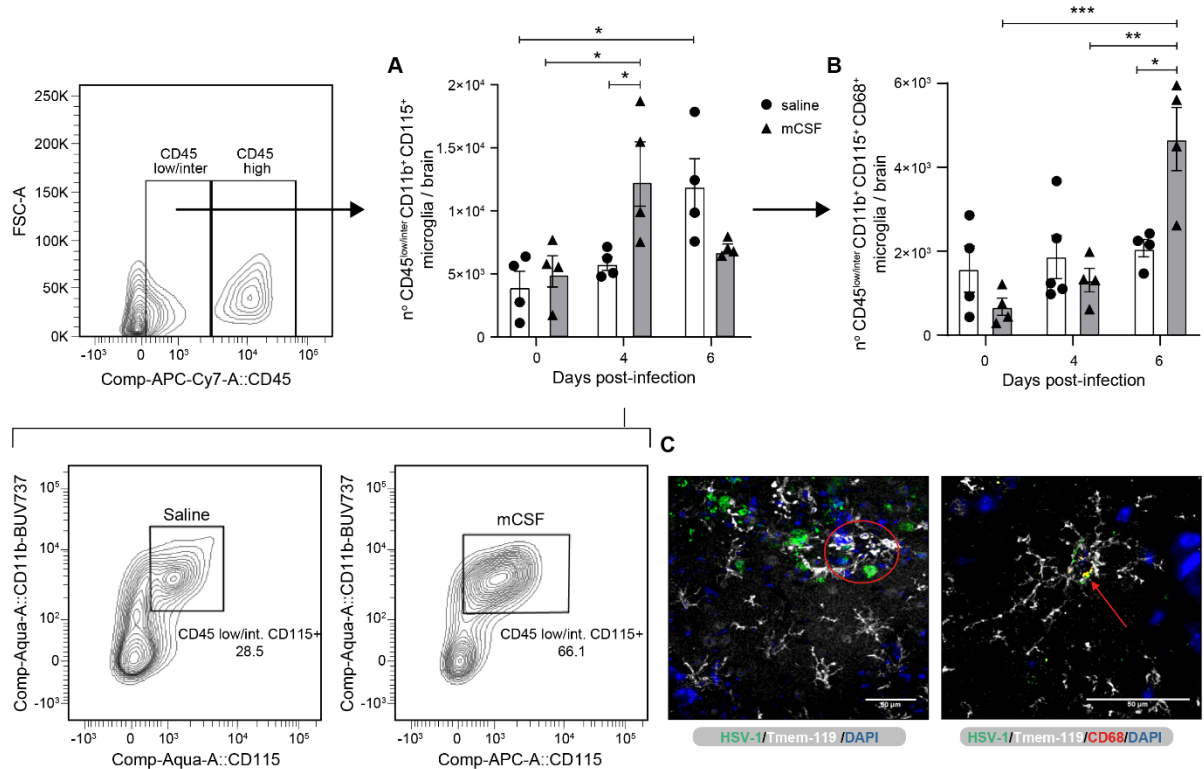


FIG 2 mCSF stimulation increases the number of microglial cells and induces their phagocytic phenotype during HSE.

Number and phagocytic phenotype of microglia in brain homogenates of mice treated with mCSF (grey; ▲) or saline (white; ●) before intranasal infection with HSV-1 strain H25. A) Absolute numbers of CD11b⁺/CD115⁺ cells in CD45^{low/int} gate corresponding to microglia was analyzed on days 0, 4 and 6 p.i. Lower panels show flow cytometry plots for brain homogenates of mice treated with saline (left panel) or mCSF (right panel) on day 4 p.i. B) Absolute numbers of CD68⁺ microglial cells. Results represent the mean ± SEM of 3 to 5 mice per group at each time point. Statistical analyses were performed using a two-way analysis of variance (ANOVA) with Tukey HSD post-hoc test. Statistically significant results are indicated as follows: *, P<0.05; **, P<0.01; ***, P<0.001. C) Immunofluorescence analyses of brain sections of mCSF-treated mice on day 6 p.i. Tmem-119⁺ (white) CD68⁺ (red) microglia surround HSV-1⁺ cells (green) in the hypothalamus region. The arrow shows co-localized signals for HSV-1, Tmem-119 and CD68. Nuclear staining was done with DAPI. Scale bar 50 μm.

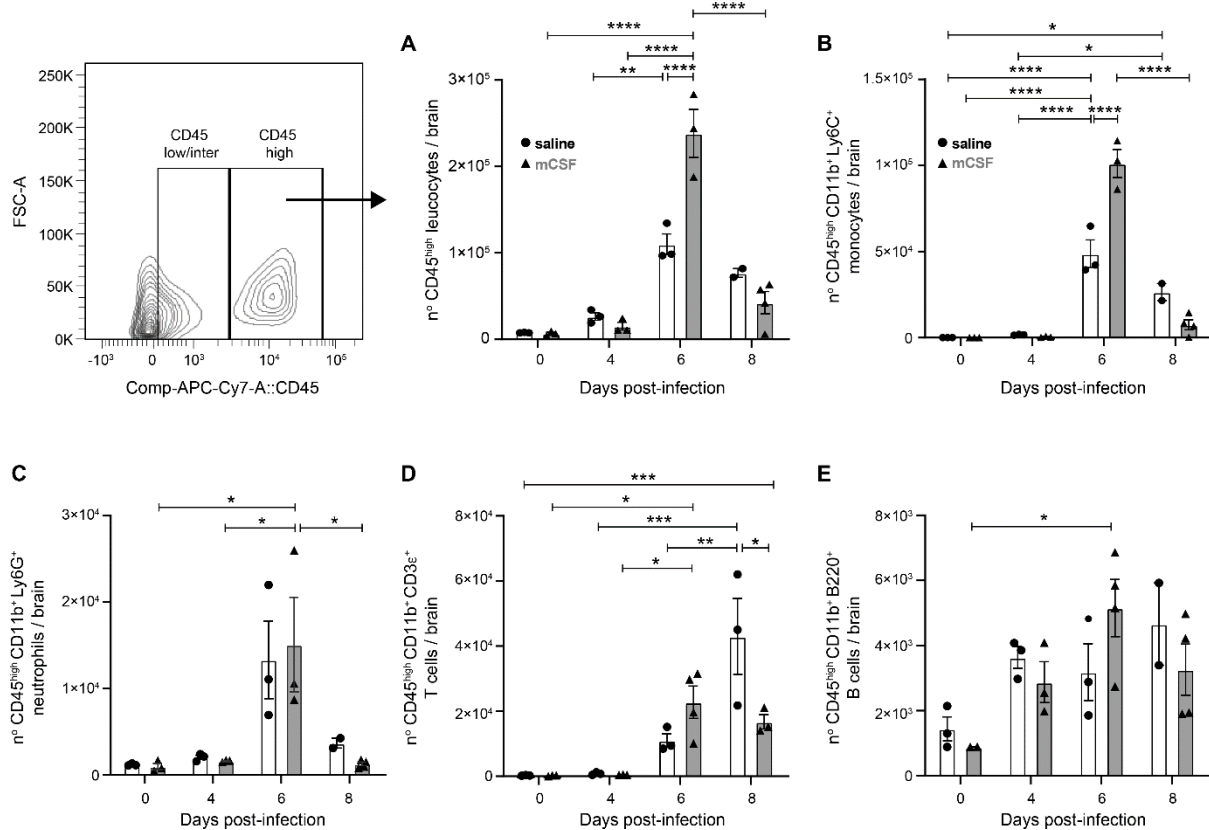


FIG 3 mCSF stimulation increases the infiltration of peripheral immune cells in the CNS during HSE.

Infiltration of peripheral immune cell subsets in brain homogenates of mCSF- (in grey; ▲) and saline-treated (in white; ●) BALB/c mice were analyzed by flow cytometry prior to (day 0) and on days 4, 6 and 8 following intranasal infection with 2,500 PFUs of HSV-1. Absolute numbers of A) CD45^{high} infiltrating leukocytes, B) CD45^{high}/CD11b⁺/Ly6C⁺ monocytes/macrophages, C) CD45^{high}/CD11b⁺/Ly6G⁺ neutrophils, D) CD45^{high}/CD11b⁺/CD3ε⁺ T lymphocytes and E) CD45^{high}/CD11b⁺/B220⁺ B lymphocytes. Results represent the mean ± SEM of 3 to 5 mice per group at each time point. Statistical analyses were performed using a two-way analysis of variance (ANOVA) with Tukey HSD post-hoc test. Statistically significant results are indicated as follows: *, P<0.05; **, P<0.01; ***, P<0.001.

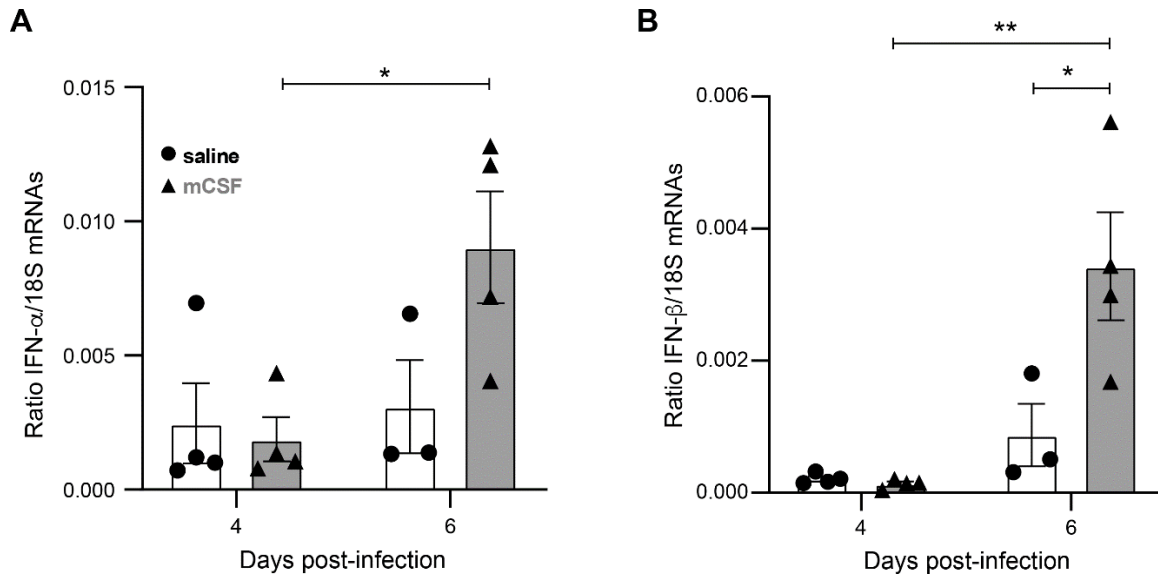


FIG 4 mCSF stimulation increases IFN- α - β mRNAs levels during HSE.

A) IFN- α and B) IFN- β mRNAs were quantified in brain homogenates of mCSF- (in grey; \blacktriangle) and saline-treated (in white; \bullet) BALB/c mice by droplet digital PCR on days 4 and 6 following intranasal challenge with 2,500 PFUs of HSV-1. The numbers of mRNA copies for each IFN were normalized to those of the housekeeping 18S ribosomal subunit. Results represent the mean \pm SEM of 3 to 4 mice per group at each time point. Statistical analyses were performed using a two-way analysis of variance (ANOVA) with Tukey HSD post-hoc test. Statistically significant results are indicated as follows: *, $P < 0.05$; **, $P < 0.01$.

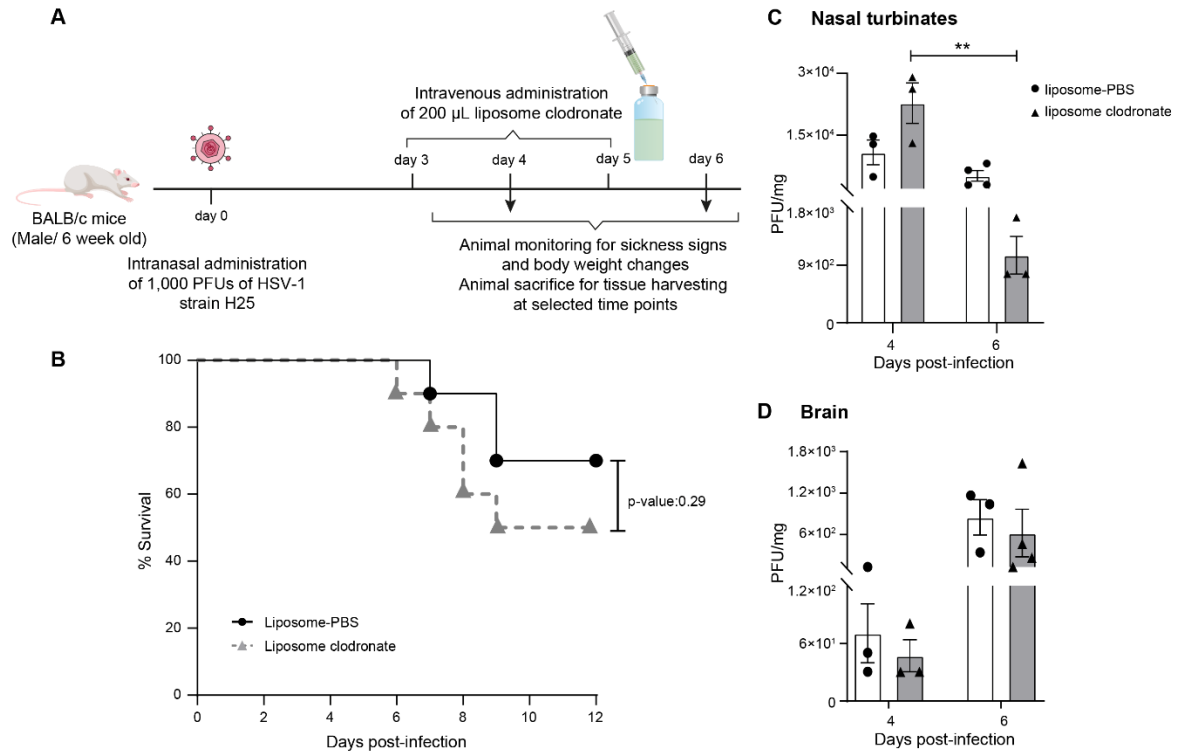


FIG 5 Liposomal clodronate treatment did not alter the survival rates of BALB/c mice during HSE.

A) Six-week old BALB/c male mice were infected intranasally with 1,000 PFUs of HSV-1 strain H25. Groups of mice (n=12 per group) received 200 μ L of liposomal clodronate or empty liposomes by intravenous injection in the tail vein once daily on days 3 and 5 post-infection. B) Survival curves of mice treated with liposomal clodronate and empty liposomes (controls). Survival rates were analysed using a log-rank (Mantel-Cox) test. D and E) Viral titers in homogenates of nasal turbinates (D) and brains (E) were measured by a standard plaque assay on Vero cells on days 4 and 6 post-infection. Results are reported as PFUs/mg of nasal turbinates or brain homogenates and represent the mean \pm SEM of 3 to 4 mice per group at each time point. Statistical analyses were performed using a two-way analysis of variance (ANOVA) with Tukey HSD post-hoc test. Statistically significant results are indicated as follows: **, P<0.01.

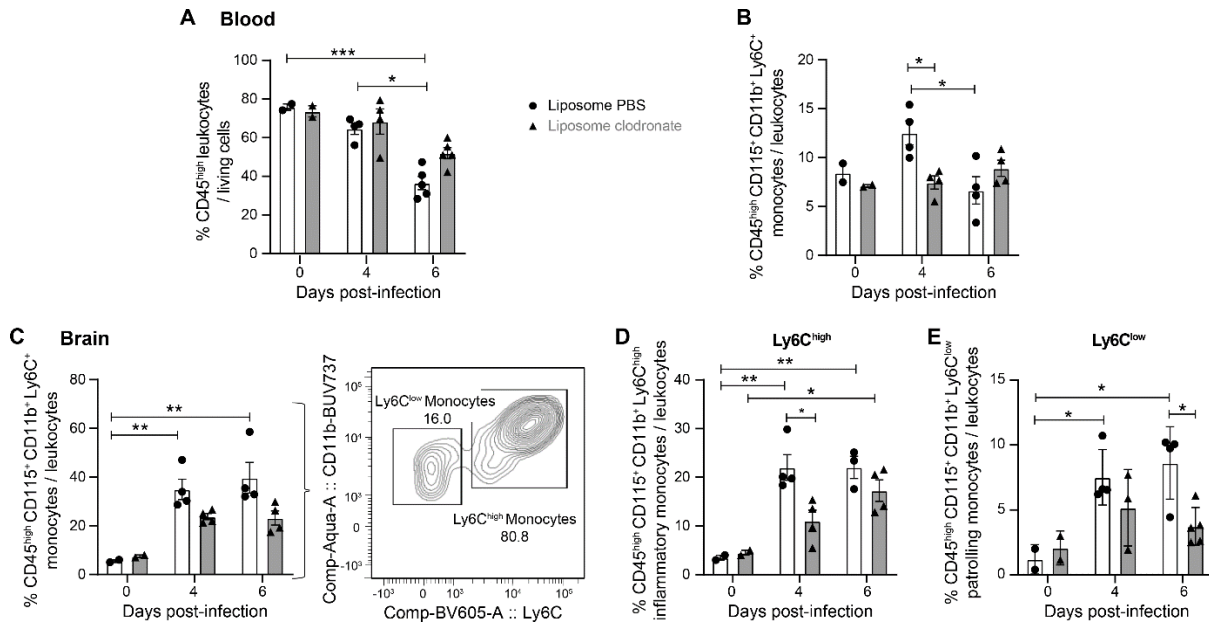


FIG 6 Blood monocyte depletion by liposomal clodronate leads to reduced monocyte infiltration in the brain during HSE.

Flow cytometry analyses of immune cells in the blood and brain homogenates of BALB/c mice infected with 1,000 PFUs of HSV-1 strain H25 and treated with liposomal clodronate (in grey; ▲) or empty liposomes (in white; ●) on days 3 and 5 p.i. A) Ratio of CD45^{high} leukocytes per living cells in the blood. B) Ratio of CD45^{high}/CD11b⁺/Ly6C⁺ monocytes/macrophages per total leukocytes in the blood. Ratio of C) infiltrating CD45^{high} leukocytes per leukocytes, D) CD45^{high}/CD11b⁺/Ly6C^{high} and E) CD45^{high}/CD11b⁺/Ly6C^{low} monocytes/macrophages per total leukocytes in the brain. Results represent the mean \pm SEM of 3 to 4 mice per group at each time point. Statistical analyses were performed using a two-way analysis of variance (ANOVA) with Tukey HSD post-hoc test. Statistically significant results are indicated as follows: *, P<0.05; **, P<0.01; ***, P<0.001.

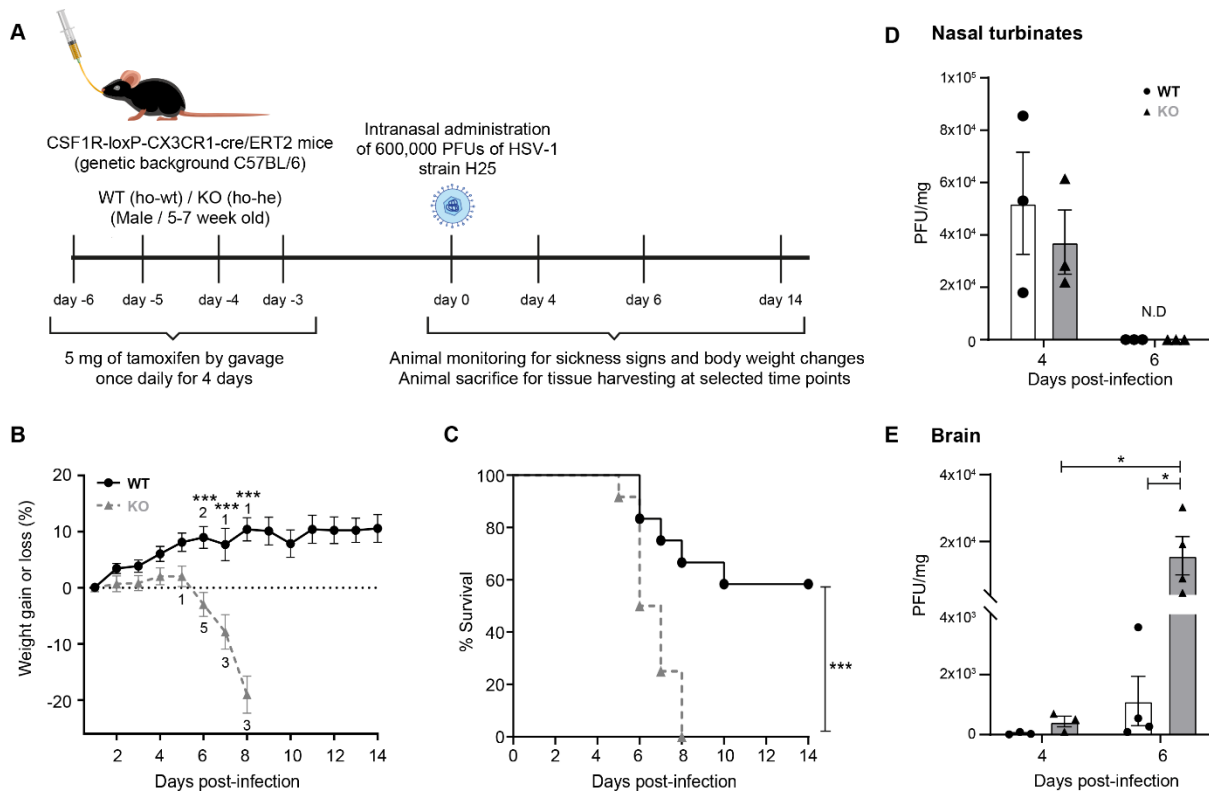


FIG 7 Microglial depletion deteriorates the survival rates and interferes with the control of viral replication in the brain.

A) Five- to seven-week old WT (ho-wt) and KO (ho-he) CSF1R-loxP-CX3CR1-cre/ERT2 mice (n=12 mice/group) received 5 mg of tamoxifen once daily for 4 days by gavage. Three days later, mice were infected intranasally with 600,000 PFUs of HSV-1 strain H25 in 20 μ L minimal essential medium. B) Percentage of body weight gain or loss of WT (●) and KO (▲) mice. The digits correspond to the number of dead mice on the indicated day for each group. C) Survival curves of WT and KO mice. Survival curves were analysed using a log-rank (Mantel-Cox) test. D and E) Viral titers in homogenates of nasal turbinates (D) and brain (E) were measured by a standard plaque assay on Vero cells on days 4 and 6 post-infection. Results are reported as PFUs/mg of nasal turbinates or brain homogenates and represent the mean \pm SEM of 3 to 4 mice per group at each time point. Statistical analyses were performed using a two-way analysis of variance (ANOVA) with Tukey HSD post-hoc test. Statistically significant results compared to those for WT group are indicated as follows: *, $P < 0.05$; ***, $P < 0.001$. N.D., not detectable.

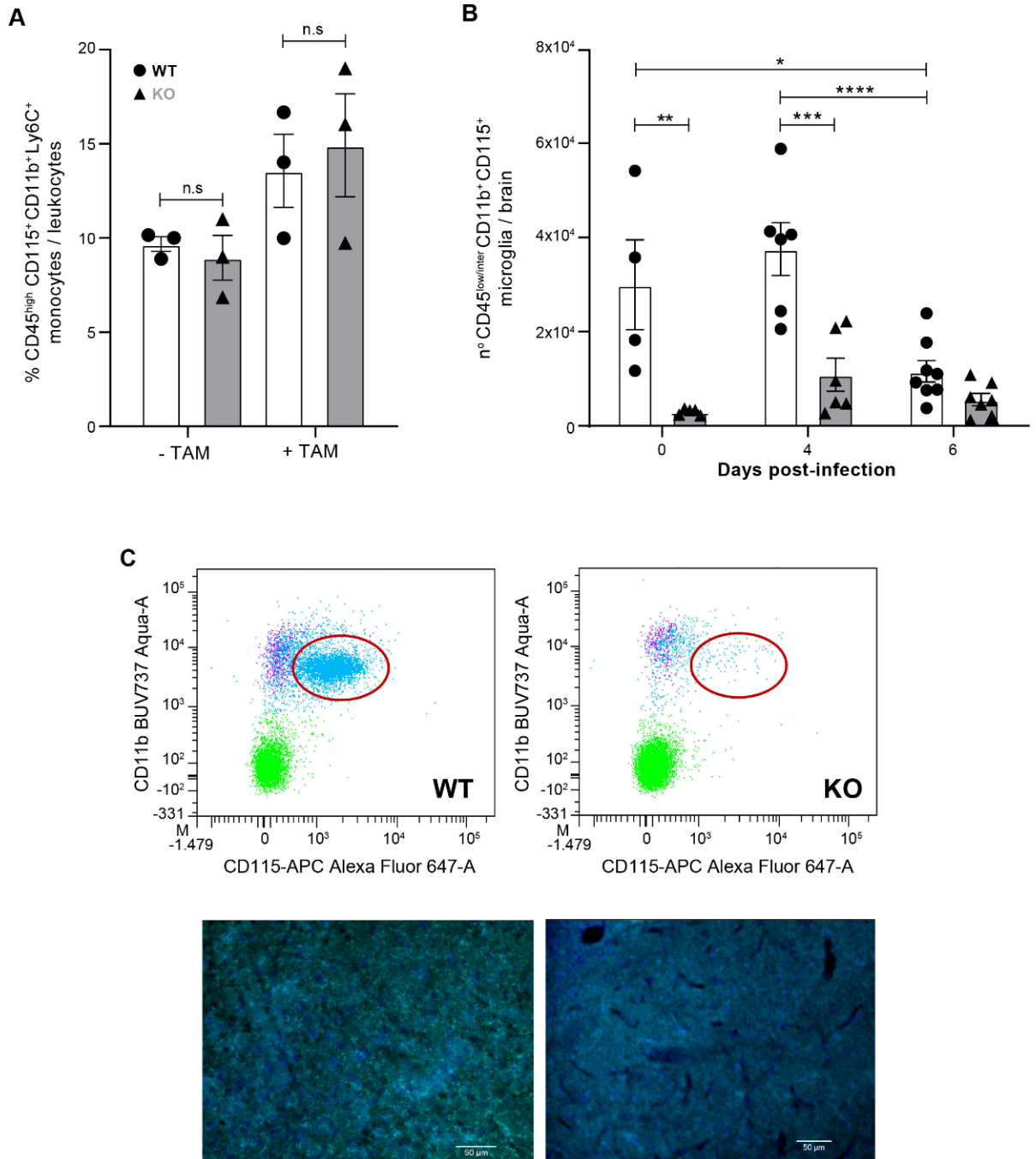


FIG 8 Conditional depletion of CSF1R in CSF1R-loxP-CX3CR1-cre/ERT2 mice leads to a specific depletion of microglia.

Five- to seven-week old wild type (WT; ho-wt; in white; ●) and knockout (KO; ho-he; in grey; ▲) mice received 5 mg/kg tamoxifen (TAM) by gavage once daily for 4 days or were left untreated. A) Percentage of CD45^{high}/CD11b⁺/Ly6C⁺/CD115⁺ monocytes per total leukocytes in blood of untreated or TAM-treated animals three days after the last dose. B)

Absolute number CD45^{low/int}/CD11b⁺/CD115⁺ microglia in brain homogenates of KO and WT mice infected with HSV-1 at different times post-challenge. Results are expressed as mean \pm SEM of 3 to 8 mice per group. Statistical analyses were performed using a two-way analysis of variance (ANOVA) with Tukey HSD post-hoc test.; *, P<0.05; **, P<0.01 and ***, P<0.001. C) Flow cytometry plots (upper) for CD45^{low/int}/CD11b⁺/CD115⁺ gate. CD115 (CSF1R) depletion was confirmed in the CNS of WT and KO animals 3 days after the last tamoxifen treatment (which corresponds to day 0). Representative confocal microscopy images (lower panels) of brain sections labeled with Tmem-119 antibody (green) and counterstained with DAPI (blue) that also showed a lack of microglia in the hypothalamic region of KO mice (right panel) compared to WT animals (left panel) three days after the last tamoxifen dose. Scale bar: 50 μ m. n.s., non-significant.

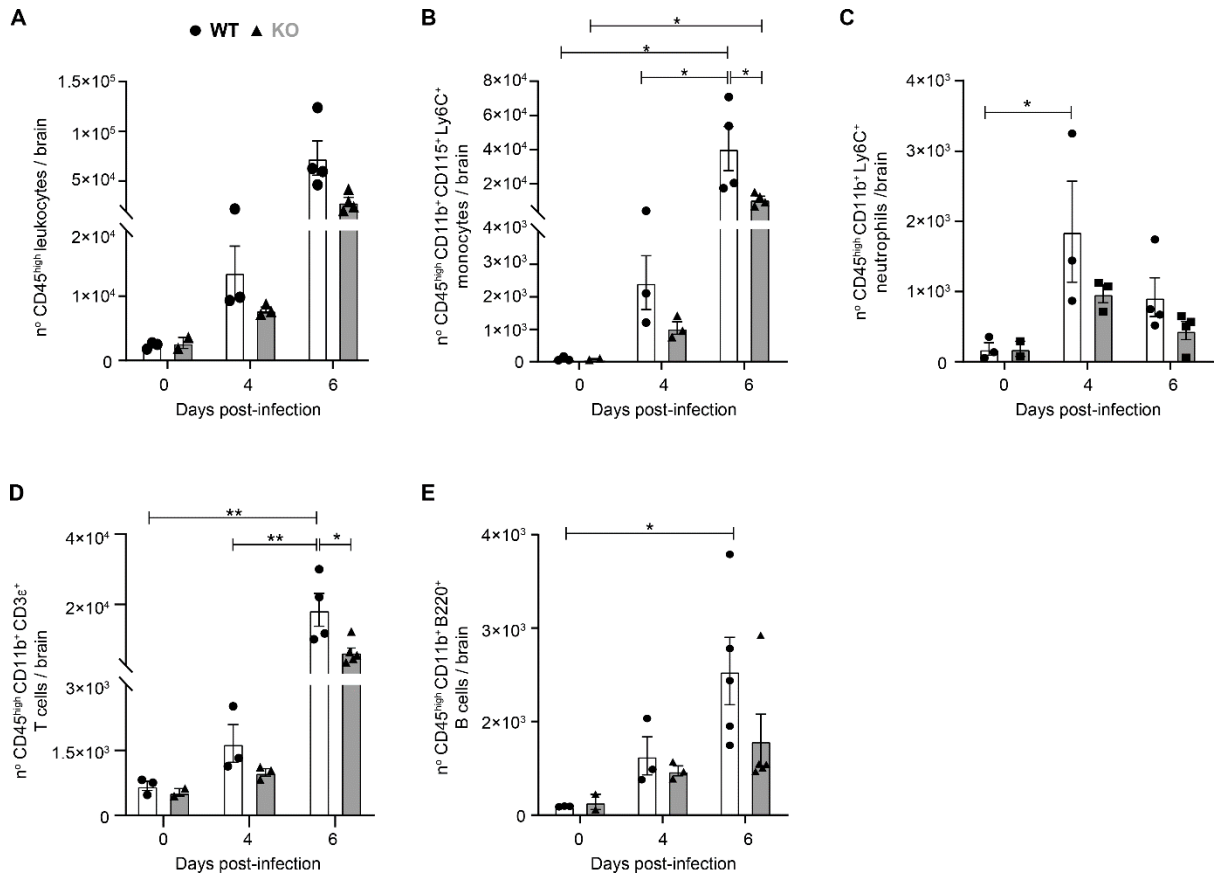


FIG 9 Mice depleted in microglia show reduced numbers of monocytes and T cells in the CNS during HSE.

Flow cytometry analyses showing the infiltration of peripheral immune cell subsets in brain homogenates of WT (in white; \bullet) and KO (in grey; \blacktriangle) mice prior to (day 0) and on days 4 and 6 following intranasal infection with 600,000 PFUs of HSV-1 strain H25. Absolute numbers of A) $CD45^{high}$ infiltrating leukocytes, B) $CD45^{high}/CD11b^{+}/Ly6C^{+}$ monocytes/macrophages, C) $CD45^{high}/CD11b^{+}/Ly6G^{+}$ neutrophils, D) $CD45^{high}/CD11b^{+}/CD3\epsilon^{+}$ T lymphocytes and E) $CD45^{high}/CD11b^{+}/B220^{+}$ B lymphocytes. Results represent the mean \pm SEM of 3 to 4 mice per group at each time point. Statistical analyses were performed using a one-way analysis of variance (ANOVA) with Tukey HSD post-hoc test. Statistically significant results are indicated as follows: *, $P < 0.05$; **, $P < 0.01$.

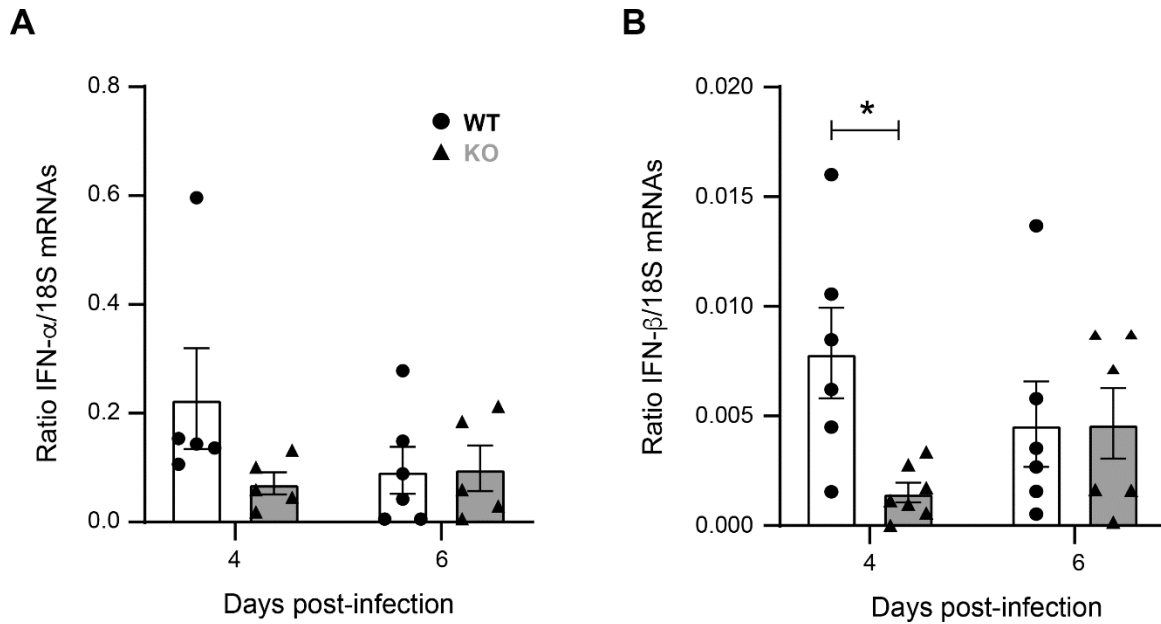


FIG 10 Mice depleted in microglia show reduced levels of IFN- α /- β mRNAs levels in the brain during HSE.

A) IFN- α and B) IFN- β mRNAs were quantified in brain homogenates of WT (in white; ●) and KO (in grey; ▲) mice by droplet digital PCR on days 4 and 6 following intranasal challenge with 600,000 PFUs of HSV-1 strain H25. The numbers of mRNA copies for each IFN was normalized to those of the housekeeping 18S ribosomal subunit. Results represent the mean \pm SEM of 5 to 7 mice per group at each time point. Statistical analyses were performed using a two-way analysis of variance (ANOVA) with Tukey HSD post-hoc test. Statistically significant results are indicated as follows: *, $P < 0.05$.

TABLE 1 Antibodies used for flow cytometry and immunofluorescence analyses

	Target	Host	Clone	Fluorochrome	Manufacturer
Flow cytometry	CD45	Rat	30-F11	APC-Cy7	BD Biosciences
	CD11b	Rat	M1/70	BUV737	BD Biosciences
	CD11c	Hamster	HL3	Pe-Cy7	BD Biosciences
	CD3ε	Hamster	145-2C11	PE-CF594	BD Biosciences
	B220	Rat	RA3-6B2	PerCP-Cy5.5	BD Biosciences
	Ly6C	Rat	AL-21	BV605	BD Biosciences
	Ly6G	Rat	1A8	FITC	BD Biosciences
	CD115	Rat	AFS98	APC	eBioscience
	CD68	Rat	FA-11	BV421	BD Biosciences
Immunofluorescence	Tmem-119	Rabbit	28-03	Unconjugated	Abcam
	HSV-1/-2	Goat	Polyclonal	No	Bio-Rad
	CD68	Rat	FA-11	No	Bio-Rad
	Goat IgG	Chicken	Polyclonal	Alexa Fluor 488	Invitrogen
	Rat IgG	Donkey	Polyclonal	Alexa Fluor 647	Invitrogen

	Rabbit IgG	Goat	Polyclonal	Alexa Fluor 546	Invitrogen
--	------------	------	------------	-----------------	------------

TABLE 2 : Cytokine and chemokine levels in brain homogenates of BALB/c mice pre-treated with mCSF

Cytokines/Chemokines	Saline-treated mice (mean \pm SEM)		mCSF-treated mice (mean \pm SEM)	
	Day 4 p.i.	Day 6 p.i.	Day 4 p.i.	Day 6 p.i.
IL-1 β	1.69 \pm 0.23	9.01 \pm 1.93	1.34 \pm 0.17	11.74 \pm 3.81
IL-2	3.69 \pm 0.22	4.33 \pm 0.31	3.20 \pm 0.23	5.65 \pm 0.50
IL-3	0.99 \pm 0.12	2.61 \pm 0.40	0.34 \pm 0.19	4.43 \pm 0.75
IL-4	0.29 \pm 0.09	1.95 \pm 0.61	0.09 \pm 0.06	3.15 \pm 0.88
IL-6	63.09 \pm 20.96	2656.93 \pm 932.98	35.07 \pm 17.36	1491.71 \pm 386.08
IL-10	17.11 \pm 0.25	229.79 \pm 39.29	10.34 \pm 1.14	423.17 \pm 41.10 **
IL-12p40	100.88 \pm 10.42	193.05 \pm 11.21	98.29 \pm 23.92	204.39 \pm 19.65
IL-13	136.65 \pm 6.45	173.18 \pm 17.66	124.80 \pm 8.10	252.19 \pm 15.13 **
IL-17A	5.74 \pm 0.35	7.30 \pm 0.47	3.61 \pm 0.25	8.44 \pm 0.81
G-CSF	479.57 \pm 146.77	27,839.72 \pm 8539.83	536.1 \pm 203.14	23,188.87 \pm 6519.42
GM-CSF	N.D.	14.69 \pm 6.55	N.D.	26.18 \pm 5.52

TNF- α	35.19 \pm 5.64	141.32 \pm 78.99	26.76 \pm 2.55	56.28 \pm 6.23
IFN- γ	50.87 \pm 13.05	474.21 \pm 42.95	26.25 \pm 5.28	949.45 \pm 146.59 **
CCL2	651.48 \pm 43.06	22625.19 \pm 3731.42	582.52 \pm 138.79	32107.95 \pm 6298.12
CCL3	33.33 \pm 5.25	924.03 \pm 105.27	20.81 \pm 3.14	1125.85 \pm 227.83
CCL4	12.67 \pm 1.41	149.49 \pm 12.24	9.46 \pm 0.83	210.73 \pm 57.25

Cytokines/chemokines levels (in pg/mL) were analyzed by a two-way ANOVA with Tukey HSD post-hoc test. Statistically significant results compared to control group (treated with saline) are indicated as follows: **, P<0.01; p.i., post-infection; N.D., not detected.

TABLE 3 Cytokine and chemokine levels in brain homogenates of WT or KO mice during HSE

Cytokines/ Chemokines	WT mice (mean \pm SEM)			KO mice (mean \pm SEM)		
	Day 0	Day 4 p.i.	Day 6 p.i.	Day 0	Day 4 p.i.	Day 6 p.i.
IL-1 α	4.03 \pm 0.08	4.63 \pm 0.39	4.60 \pm 0.59	3.92 \pm 0.77	5.23 \pm 0.38	7.98 \pm 0.83 *
IL-1 β	1.04 \pm 0.02	0.99 \pm 0.05	1.04 \pm 0.12	1.07 \pm 0.11	0.92 \pm 0.05	1.86 \pm 0.19 *
IL-2	2.59 \pm 0.07	3.09	2.95 \pm 0.07	3.09 \pm 0.45	2.66 \pm 0.12	4.02 \pm 0.19 **
IL-3	0.57 \pm 0.10	0.57 \pm 0.10	0.52 \pm 0.09	0.57 \pm 0.30	0.61 \pm 0.13	1.32 \pm 0.15 *

IL-4	0.20 ± 0.08	0.08 ± 0.05	0.23 ± 0.06	0.08 ± 0.05	0.08 ± 0.05	0.39 ± 0.06
IL-5	0.67 ± 0.11	1.11 ± 0.21	0.99 ± 0.11	111 ± 0.16	1.58 ± 0.21	2.72 ± 0.37 **
IL-6	1.33 ± 0.09	4.64 ± 1.96	5.87 ± 2.07	1.17 ± 0.14	9.84 ± 2.87	152.30 ± 77.09
IL-10	7.98 ± 1.62	6.21 ± 0.79	13.93 ± 3.29	5.67 ± 1.90	5.29 ± 0.46	55.10 ± 10.49 ***
IL-12p40	199.24 ± 17.70	185.82 ± 37.58	236.91 ± 7.12	136.18 ± 8.38	161.12 ± 22.72	468.27 ± 67.39 ***
IL-13	107.81 ± 5.84	111.24 ± 3.31	111.11 ± 6.74	104.50 ± 3.43	131.91 ± 9.66	145.70 ± 8.91 *
IL-17A	2.62 ± 0.31	3.12 ± 0.10	3.22 ± 0.13	2.52 ± 0.80	2.35 ± 0.05	5.89 ± 0.64 **
G-CSF	5.93 ± 0.43	66.31 ± 28.16	38.65 ± 13.08	9.31 ± 2.20	224.22 ± 62.92	774.09 ± 283.07 **
GM-CSF	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.
TNF-α	50.82 ± 20.74	44.39 ± 3.88	49.01 ± 6.04	61.17 ± 16.09	25.65 ± 1.20	60.28 ± 7.42
IFN-γ	9.95 ± 1.01	10.18 ± 0.40	13.26 ± 2.90	10.42 ± 1.46	8.22 ± 0.50	96.84 ± 27.03 ***
CXCL1	24,157 ± 3,614	47,010 ± 11,832	42,370 ± 9,045	29,543 ± 8,520	48,393 ± 2,852	98,083 ± 10,686 **
CCL2	177.01 ± 34.83	275.14 ± 64.03	395.50 ± 104.29	353.72 ± 216.92	1,202.87 ± 76.93	3,231.88 ± 676.54 ***
CCL3	15.74 ± 1.03	19.54 ± 5.72	21.97 ± 2.50	19.01 ± 4.89	36.14 ± 2.70	107.35 ± 39.72 **
CCL4	4.29 ± 1.61	4.16 ± 0.41	5.76 ± 0.45	5.99 ± 0.44	4.86 ± 0.40	15.81 ± 2.67 ***
CCL5	12,293 ± 5,679	27,853 ± 9,422	114,830 ± 27,871	9,063 ± 1,041	29,747 ± 2,912	340,294 ± 87,384 *

Cytokines/chemokines levels (in pg/mL) were analyzed by a two-way ANOVA with Tukey HSD post-hoc test. Statistically significant results compared to WT mice are indicated as follows: *, $P < 0.05$; **, $P < 0.01$ and ***, $P < 0.001$; p.i., post-infection; N.D., not detected.

Chapitre-IV : L'analyse transcriptionnelle des cellules immunitaires isolées du noyau postéro-ventral a révélé une contribution potentielle des microglies infectées à la réponse inflammatoire exacerbée au cours de l'EH expérimentale

Avant-propos

Le chapitre-IV correspond à un article « **Single-cell transcriptomics of the ventral posterolateral nucleus-enriched thalamic regions from HSV-1-infected mice reveal a novel microglia/microglia-like transcriptional response** » dont je suis le premier auteur et qui a été publié dans la revue « *Journal of Neuroinflammation* » en 6 Avril 2022.

PMID: 35387656 - DOI: [10.1186/s12974-022-02437-7](https://doi.org/10.1186/s12974-022-02437-7)

1. Résumé :

Les infections au virus herpès simplex I (VHS-1) sont souvent bénignes mais peuvent être responsables de pathologies sévères, comme l'encéphalite herpétique (EH). Malgré la disponibilité des antiviraux, le taux de mortalité est de 30%. De plus, majorité des survivants souffrent des séquelles neurologiques. Il est donc nécessaire de mieux comprendre la réponse immunitaire anti-herpétique afin d'améliorer le pronostic de l'EH. Dans notre étude, les mécanismes impliqués dans la réponse immunitaire microgliale au cours de l'EH ont été investigués, à l'aide de la microscopie électronique et du séquençage d'ARNm sur une cellule unique. Nous avons choisi d'étudier uniquement les microglies situées dans le noyau postéro-ventral (VPL, pour « *Ventral posterolateral nucleus* »), qui a été identifié comme la région la plus infectée du cerveau chez des souris C57BL/6 au J6 p.i. Nos analyses ont confirmé que ces cellules limitaient l'infection à l'aide de la phagocytose et de la présentation d'antigènes. En outre, nous avons pu décrire une nouvelle réponse transcriptionnelle, associée à une population cellulaire rare, que nous avons appelées des microglies « *en transition* ». L'expression élevée des transcrits viraux par ces cellules pourrait correspondre à la réponse immunitaire antivirale intrinsèque des microglies infectées par le VHS-1 dans le VPL. Enfin, l'analyse de ce transcriptome révélant l'augmentation d'expression des gènes impliqués dans la production d'interleukine IL-1 β médiée par l'inflammasome NLRP3 a suggéré que ces microglies « en transition » infectées favoriseraient l'exacerbation de l'inflammation au cours de l'EH.

2. Abstract

Background

Microglia participate in the immune response upon central nervous system (CNS) infections. However, the role of these cells during herpes simplex encephalitis (HSE) has not been fully characterized. We sought to identify different microglia/microglia-like cells and describe the potential mechanisms and signaling pathways involved during HSE.

Methods

The transcriptional response of CD11b⁺ immune cells, including microglia/microglia-like cells, was investigated using single-cell RNA sequencing (scRNA-seq) on cells isolated from the ventral posterolateral nucleus (VPL)-enriched thalamic regions of C57BL/6N mice intranasally infected with herpes simplex virus-1 (HSV-1) (6 x 10⁵ PFUs/ 20 μL). We further performed scanning electronic microscopy (SEM) analysis in VPL regions on day 6 post-infection (p.i.) to provide insight into microglial functions.

Results

We describe a novel microglia-like transcriptional response associated with a rare cell population (7% of all analyzed cells), named “in transition” microglia/microglia-like cells in HSE. This new microglia-like transcriptional signature, found in the highly infected thalamic regions, was enriched in specific genes (*Retnlg*, *Cxcr2*, *Il1f9*) usually associated with neutrophils. Pathway analysis of this cell-type transcriptome showed increased NLRP3-inflammasome-mediated interleukin IL-1β production, promoting a pro-inflammatory response. These cells' increased expression of viral transcripts suggests that the distinct “in transition” transcriptome corresponds to the intrinsic antiviral immune signaling of HSV-1 infected microglia/microglia-like cells in the thalamus. In accordance with this phenotype, we observed several TMEM119⁺/IBA-I⁺ microglia/microglia-like cells immunostained for HSV-1 in highly infected regions.

Conclusion

A new microglia/microglia-like state may potentially shed light on how microglia could react to HSV-1 infection. Our observations suggest that infected microglia/microglia-

like cells contribute to an exacerbated CNS inflammation. Further characterization of this transitory state of the microglia/microglia-like cell transcriptome may allow the development of novel immunomodulatory approaches to improve HSE outcomes by regulating the microglial immune response.

Keywords

Herpes simplex virus 1, encephalitis, transcriptomics, antiviral immune response, microglia

3. Article 3

Single-cell transcriptomics of the ventral posterolateral nucleus-enriched thalamic regions from HSV-1-infected mice reveal a novel microglia/microglia-like transcriptional response

Olus Uyar^{1#}, Juan Manuel Dominguez^{2#}, Maude Bordeleau^{3,4}, Lina Lapeyre¹, Fernando González Ibáñez^{4,6}, Luc Vallières^{4,5}, Marie-Eve Tremblay^{4,9}, Jacques Corbeil^{2,5}, Guy Boivin^{1}*

¹Research Center in Infectious Diseases, CHU de Québec-Laval University Research Center and Department of Pediatrics and Microbiology, Faculty of Medicine, Laval University, Quebec City, QC, Canada

²Research Center in Infectious Diseases, CHU de Québec-Laval University Research Center and Department of Molecular Medicine and Big Data Research Centre, Faculty of Medicine, Laval University, Quebec City, QC, Canada

³Integrated Program in Neuroscience, McGill University, Montreal, QC Canada

⁴Neurosciences Unit, CHU de Québec-Laval University Research Center, Quebec City, QC Canada

⁵Department of Molecular Medicine, Laval University, Quebec City, QC Canada

⁶Division of Medical Sciences, University of Victoria, Victoria, BC Canada

⁷Department of Neurology and Neurosurgery, McGill University, Montreal, QC Canada

⁸Department of Biochemistry and Molecular Biology, The University of British Columbia, Vancouver, BC Canada

⁹Centre for Advanced Materials and Related Technology (CAMTEC), University of Victoria, Victoria, BC, Canada

#Both authors contributed equally.

* **Correspondence:** Guy.Boivin@crchudequebec.ulaval.ca

Abstract word count: 287

Main text word count: 8975

Figures: 6

Supplementary Figures: 5

Table: 1

3.1. Background

Herpes simplex virus 1 (HSV-1), a member of the alphaherpesvirinae subfamily, establishes lifelong latent infections in trigeminal ganglia (1, 2). Occasional reactivations of the virus usually result in cold sores (3). However, this neurotropic virus sometimes causes life-threatening pathologies such as herpes simplex encephalitis (HSE). HSE is the most frequent lethal sporadic acute form of viral encephalitis globally, with a mortality rate of 30% despite antiviral therapy. Of the surviving patients, half suffers significant neurological sequelae due to neuronal and glial damage (4, 5). The present paradigm is that viral replication and an over reactive immune response are the two main factors contributing to CNS damages (6). Additional studies are required to characterize in-depth the molecular pathways mediating the immune response during HSE. Moreover, understanding the molecular mechanisms that generate this inflammation would drive the development of efficacious immunomodulatory strategies.

One of the drivers of neuroinflammation is microglia, which usually protects the CNS against foreign agents (7-9). Microglia are a heterogeneous population that consists of diverse subtypes with different properties depending on their localization in the CNS (10). They are the first immune cells to encounter HSV-1 in the CNS. Upon recognizing a pathogen, microglial cells can change from a ramified to an amoeboid morphology and migrate toward infected cells. Increased cytokines/chemokines production by these cells restricts viral spread (11-13). Conflicting results have been reported regarding the impact of microglia in different neuroinflammatory disorders, including HSE. TLR2-mediated activation of microglia inducing oxidative stress was shown to be responsible for neurotoxicity during HSV-1 infection. In contrast, an absence of microglia in the early stage of infection worsens the outcome of the disease, suggesting their beneficial role in orchestrating an early protective immune response by regulating type-I Interferon (IFN) response and peripheral immune cell

infiltration (14-18). Despite various studies characterizing the role of microglia in HSE, a transcriptomic study on these immune cells isolated from HSV-1 infected CNS is still missing.

Following the early microglial response to HSV-1, an important number of peripheral immune cells infiltrate the CNS. One of the most abundant peripheral immune cells found in the HSV-1-infected brain is monocytes. Despite their distinct ontogeny from the bone marrow (instead of embryonic yolk sac), monocytes share common characteristics with resident microglia (9, 19). During CNS inflammation, infiltrating myeloid cells, mostly monocytes, can colonize the brain and transform into long-lived ramified microglia-like cells, previously termed bone marrow-derived microglia, which are highly enriched in microglial markers (20, 21). Because of their similar antigenic profiles, microglia and infiltrating monocytes are difficult to distinguish (22). Several studies have shown that monocyte-derived macrophages contribute to HSE by phagocytosing infected cells and releasing cytokines/chemokines, reactive oxygen species (ROS), and nitric oxide (NO) (23, 24). However, an uncontrolled monocyte mediated-inflammatory response is also considered a potential threat, similar to an exaggerated microglial response, leading to CNS damage (25). Here, we identified signature markers for monocytes and microglia, which allowed us to decipher their respective transcriptional responses upon HSV-1 infection.

Single-cell RNA sequencing (scRNA-seq) has become a frequently used tool in infectious disease research, allowing the identification of biomarkers and pathways to elucidate molecular mechanisms of immune regulation (26, 27). Furthermore, the analysis of pathogen mRNA using scRNA-seq can permit the identification of their targets (28). We combined scRNA-seq and electron microscopy to analyze the cellular transcriptomic signatures and visualize the phenotypic changes of microglia *versus* bone marrow-derived microglia-like cells during HSE.

We show that moderately infected thalamic areas harbor highly phagocytic reactive microglia. In contrast, highly infected thalamic regions accommodate microglia/microglia-like cells with impaired physiological functions such as decreased phagocytic activity. Our scRNA-seq analysis further reveals a novel transcriptional signature that we defined as “in transition” microglia/microglia-like cells, in highly infected thalamus. Finally, we

demonstrate that the “in transition” transcriptome corresponds to the immune response of HSV-1 infected microglia/microglia-like cells acquiring a pro-inflammatory phenotype. Our study provides novel insights into microglia/microglia-like cell response during HSE and reveals potential pathways implicated in the antiviral mechanisms of HSV-1 infected microglia.

3.2. Methods

Animals

Six-week-old male C57BL/6N mice were purchased from Charles River, Canada. Mice were slightly anesthetized and infected with clinical HSV-1 strain H25 or recombinant HSV-1 (rHSV-1) in 20 μ L of the minimum essential medium by intranasal inoculation (29). Similar amounts of viral suspension were equitably administered to the right and the left mouse nostrils. Animals were acclimated to standard laboratory conditions for one week and housed three to four per cage.

Evaluation of clinical signs of HSE

Mice were monitored for HSE-related signs: ruffled fur, ocular swelling, shaking movements, swollen forehead, breathing difficulties, bodyweight loss, and mortality twice daily for fourteen days. Animals were sacrificed when a bodyweight loss equal to or greater than 20% was achieved, or a combination of two other obvious sickness signs were observed.

In our HSE mouse model, symptoms are correlated with the brain viral titers. Based on the evaluation of clinical signs, mice could be divided into two categories: moderately- (weight loss, ruffled fur) and highly- (weight loss, ruffled fur, swollen forehead +/- neurological signs) infected mouse. Thalamus collected from these moderately- or highly-infected mice were called moderately- or highly-infected thalamus, respectively.

Infectious viral titer measurements

Mice were anesthetized by intraperitoneal injection of a mixture of ketamine/xylazine (at doses of 90 mg/mL and 10 mg/mL, respectively) and sacrificed by intracardiac perfusion with cold 0.9% saline. Brains were harvested on day 6 p.i. and separated into four regions: olfactory bulb, cerebral cortex, hippocampus/hypothalamus, and hindbrain (cerebellum, pons, and medulla) to identify infected areas. The brain tissues were first homogenized, then

viral titers for each of four HSV-1 infected-brain parts were determined by counting plaque-forming units (PFUs)/mg in Vero cells, as described elsewhere (30). In another mouse experiment, following the dissection of the thalamus/hypothalamus region used for single-cell preparation, the rest of the brain tissues was homogenized, and viral titers were determined, as described previously.

Immunostaining studies

Mice were sacrificed by intracardiac perfusion with cold 0.9% saline followed by a 4% paraformaldehyde (PFA) solution in 0.1M borax buffer, pH 9.5, at 4°C. Extracted brains were post-fixed for 24 h and then placed in 20% sucrose diluted in 4% PFA for 24 h. Fixed brains were cut in 25- μ m coronal and sagittal sections on dry ice using a microtome (Reichert-Jung, Cambridge Instruments Company). Free-floating sections were prepared for immunostaining with different antibodies (Table 1, Immunofluorescence), as described elsewhere (19). Sections were mounted onto SuperFrost slides (Fisher Scientific) and coverslipped with Fluoromount-G (Electron Microscopy Sciences) for immunofluorescence (IF) studies. Confocal fluorescence microscopy images were captured using a Confocal Quorum WaveFX spinning-disk confocal microscope (Quorum Technologies) equipped with a Hamamatsu ImageEM camera (Hamamatsu Corporation). Images were acquired using Volocity 4 software (Perkin Elmer).

Tissue collection for electron microscopy

On days 0 and 6 p.i., a subset of animals (n=3 mice per time point) was anesthetized with a mixture of ketamine hydrochloride and xylazine (at doses of 90 mg/ml and 10 mg/ml, respectively). Mice were blood-flushed by intracardiac perfusion with ~15 ml ice-cold phosphate-buffered saline (PBS, pH 7.4) and then perfused with ~75 ml ice-cold 3.5% (w/v) acrolein in 100 mM phosphate buffer (PB, pH 7.4), followed by ~150 ml ice-cold 4% (w/v) PFA in PB. Brains were extracted, post-fixed in ice-cold 4% (w/v) PFA in PB for 2 h and washed in 50 mM PBS-pH 7.4, three times for 10 min. Fixed brains were then sectioned into 50 μ m-thick coronal sections using a vibratome (VT1200S, Leica) and stored in a cryoprotectant solution (30% (v/v) ethylene glycol, 30% (v/v) glycerol in PBS) at -20°C until use.

Immunostaining for electron microscopy

Two sections containing the ventral posterior nucleus (VPN) of the thalamus (Bregma -1.35 to -1.46; stereotaxic atlas of Paxinos and Franklin 4th edition (Paxinos and Franklin, 2013)) were used for immunostaining against HSV-1. Sections were washed in 25 mM potassium-phosphate buffered saline (KPBS, pH 7.4) three times for 10 min. Sections were quenched with 0.3% (v/v) H₂O₂ in KPBS for 10 min and washed in KPBS three times for 10 min. Sections were incubated with 0.1% (w/v) NaBH₄ in KPBS for 30 min and washed in KPBS three times for 10 min. Next, sections were incubated in a blocking solution consisting of 4% normal donkey serum (Sigma), 1% bovine serum albumin (Sigma), 0.03% Triton X-100 (Sigma) in KPBS at room temperature (RT) for 30 min. Sections were finally incubated with goat anti-HSV1/2 (Bio-Rad) in KPBS (1:1000) at 4°C overnight. On the following day, tissues were washed in KPBS five times for 5 min before incubation with donkey anti-goat 1.4 nm Nanogold-conjugated (Nanoprobes, Yaphank, NY, USA) secondary antibody (1:50) in KPBS at 4°C overnight. The next day, brain sections were washed in KPBS five times for 5 min then twice for 5 min in freshly prepared 3% (w/v) sodium acetate solution. Staining was then revealed for 1 min at RT by silver enhancement (Nanoprobes). Sections were quickly rinsed in 3% sodium acetate solution, further rinsed in PB three times for 5 min, and washed in PBS five times for 3 min.

Tissue processing for electron microscopy

After staining, tissues were post-fixed with osmium tetroxide and thiocarbohydrazide for scanning electron microscopy imaging. Brain sections were first immersed in a mixture (1:1) of 3% potassium ferrocyanide (BioShop, Burlington, ON, Canada) in PB and 4% aqueous osmium tetroxide (Electron Microscopy Sciences) at RT for 1 h and rinsed in Milli-Q water five times for 3 min. Sections were placed in 1% thiocarbohydrazide solution (Electron Microscopy Sciences) at RT for 20 min and rinsed in Milli-Q water five times for 3 min. Sections were then placed in 2% aqueous osmium tetroxide at RT for 30 min and washed in Milli-Q water five times for 3 min. Sections were further dehydrated in ascending ethanol concentrations (twice in 35%, once in 50%, once in 70%, once in 80%, once in 90%, three times in 100%), followed by propylene oxide (three times) for 5 min each. Sections were finally embedded in 100% Durcupan ACM resin (Electron Microscopy Sciences) for

24 h, then mounted between labeled ACLAR sheets (Electron Microscopy Sciences) embedded in a thin layer of resin and let to polymerize at 55°C for three days. After resin polymerization, one of the ACLAR sheets was removed. The ventral posterior nucleus (VPN) of the thalamus was excised and glued on top of a resin block for ultramicrotomy. Ultrathin (~70 nm) sections were cut with an ultramicrotome (Ultracut UC7, Leica Biosystems), collected to a silicon nitride chip (Electron Microscopy Sciences), and glued on specimen mounts (Electron Microscopy Sciences). Samples were examined by array tomography at 5 nm (x, y) resolution using a Crossbeam 540 (GeminiSEM, Zeiss) field emission scanning electron microscope, with an acceleration voltage of 1.4 kV and current of 1.2 nA.

Microglial analysis at the nanoscale resolution

Microglia/microglia-like cells were identified by their irregular nuclei with a dark heterogeneous chromatin pattern and an irregular cytoplasm, as well as frequent long stretches of endoplasmic reticulum cisternae and lipidic inclusions (i.e., lipofuscin, lysosomes), among other distinctive ultrastructural features (31). Microglial/microglial-like cell ultrastructural analysis was performed using ImageJ software by an experimenter blind to the experimental conditions (n=36-46 microglial cell bodies/group, N=3 animals/group). Microglial organelles—lysosomes, lipidic inclusions, endosomes, endoplasmic reticulum, and Golgi apparatus cisternae, and mitochondria—as well as microglial interactions with their microenvironment—neurons, astrocytes, oligodendrocytes, microglia-like cells, synaptic elements, dark cellular processes, myelinated axons, myelin, blood vessels, and extracellular space pockets—were first qualitatively and quantitatively analyzed (32). Afterward, HSV-1 nanogold particles were quantitatively analyzed in the microglia/microglia-like cells; the number of nanogold particles was counted, and the specific sub-compartment (organelles) for each analyzed particle was identified. Microglia/microglia-like cells were considered immunostained when at least two nanogold particles were visible within their nucleus, cell body, or plasma membrane. Additionally, their contacts with infected cells identified by immunostaining were also assessed.

Lysosomes were identified by their dense heterogeneous contents enclosed by a single well-defined membrane and classified into immature or mature lysosomes. The latter is fused with endosomes and possesses lipofuscin granules (oval structure of finely granular

composition with a fingerprint-like pattern) (33-35). Endosomes were categorized as empty and digested, while their total number was also determined. Dilation of the endoplasmic reticulum or Golgi apparatus was characterized by a distance between cisternae greater than 50 nm (36). In addition to determining the total count of mitochondria, mitochondrial abnormalities that included elongated (length > 1 μ m) and donut-shaped mitochondria (32, 37) were quantified.

Synapses were recognized by the contact between a presynaptic axon terminal containing synaptic vesicles and a postsynaptic spine, often with a visible postsynaptic density at their junction. Dark processes, which can belong to microglia/microglia-like cells, among other cell types, were also examined. These structures show a condensed cytoplasm and frequently contain organelles showing alterations associated with cellular stress. Myelinated axons were recognized by their compact and electron-dense myelin sheath surrounding the axons. Myelin abnormalities were also identified, including myelin decompaction (distancing of myelin sheaths) and degenerating myelin (ballooning, swelling, or degradation). Neurons were distinguished by pale nuclei and cytoplasm, often with apical dendrite and innervation from axon terminals. Like neurons, astrocytes are characterized by pale nuclei and cytoplasm but recognized by their nuclear heterochromatin pattern that forms a thin rim on the edge and their irregular and angular cytoplasm that often contains intermediate filaments. Similar to microglia/microglia-like cells, oligodendrocytes were identified by their dark nuclei with a heterogeneous chromatin pattern and a dark squarish or rectangular-shape cytoplasm, often containing short and wide endoplasmic reticulum cisternae organized in the vicinity of the nucleus and ribosomes, as well as broader space between nuclear membranes than microglia/microglia-like cells (31). Finally, extracellular space pockets were quantified directly juxtaposed with microglia/microglia-like cells. Extracellular space pockets containing degraded elements or debris were designated as extracellular digestion, also known as digestive “exophagy” (31, 38, 39).

Flow cytometry analyses of brain homogenates

Mice were deeply anesthetized as described above and perfused intracardially with ice-cold DPBS (Dulbecco's phosphate-buffered saline, pH 7.4) without Ca^{2+} and Mg^{2+} before harvesting brains. The thalamic/hypothalamic region was dissected and chopped into fine

bits using a razor blade. For the dissociation, minced tissue was incubated in DPBS without Ca^{2+} and Mg^{2+} containing papain (20 units/mL, prepared as described in the manufacturer's instructions) and DNase-I (100 $\mu\text{L}/\text{ml}$) for 30 min at 37°C. Homogenates were filtered through a 100 μm then 70 μm cell strainer (BD Biosciences). After a washing step, cells were centrifuged at 600 $\times g$ for 40 min in a Percoll gradient (37% and 80%) (GE Healthcare). The cell ring at the interphase was collected, centrifuged at 300 $\times g$ for 10 min, and washed twice with DPBS containing 2% fetal bovine serum (FBS; Wisent). Cells were incubated with CD16/CD32 (Mouse BD Fc Block™ 2.4G2) and FVS510 (viability) on ice for 30 min. After a washing step, cells were incubated with a pool of antibodies (Table 1, Flow Cytometry). For CD115 staining, cells were washed once, permeabilized with eBioscience™ Foxp3/Transcription Factor Staining kit, and incubated for 60 min, following the first incubation with the antibody pool. Labeled cells were fixed, washed, and resuspended in DPBS. Flow cytometry analyses and data acquisition were performed using a BD SORP LSR II and BD FACSDiva software, respectively.

Single CD11b⁺ cell suspension for sequencing

For single-cell sequencing, mice were transcardially perfused with DPBS, and brains were quickly dissected on ice. As described above, the minced thalamic/hypothalamic regions were enzymatically digested with papain. The tissue was then gently mashed through a 70 μm cell strainer to have a single cell suspension. The cell suspension was washed with ice-cold DPBS without Ca^{2+} and Mg^{2+} containing 20 mM ethylenediaminetetraacetic acid (EDTA) and 5% of heat-inactivated FBS. As described previously, the cell ring from the Percoll gradient step was collected, centrifuged, and washed twice with magnetic-activated cell sorting (MACS) buffer. Ten μL of CD11b (Microglia) MicroBeads (Miltenyi) were added into 90 μL of cell suspension. Following 15 min of incubation at 4 °C, cell suspension with magnetic beads was applied onto MS MAC columns to isolate CD11b⁺ microglia/microglia-like cells and immune cells, as described in the manufacturer's instructions. CD11b⁺ cells were counted manually using trypan blue with a standard hemocytometer to measure cell suspension concentration and cell viability. For each sample, 5×10^3 - 1×10^4 cells incubated with FVS510 viability stain were also analyzed by BD SORP LSR II to confirm the % of viability. Cells were then centrifuged and resuspended in DPBS

to have a final concentration of 700-1000 cells/ μ L, required for Chromium (10x Genomics) single-cell sequencing.

Single-cell library construction and sequencing:

Single cells from two independent experiments of two (one infected and one uninfected) and three (two infected and one uninfected) samples each were processed using Chromium™ Next GEM Single Cell 3' GEM, Library & Gel Bead Kit v3.1 Kit following the manufacturer's user guide (10x Genomics, Pleasanton, CA). After MACS sorting, cells were spun down for each experiment, resuspended in 100 μ L of PBS, and subjected to cell quality control using BioRad TC10 automated cell counter (Bio-RAD, Mississauga, Canada). All processed samples had cell viability >80%. After determining cell density, cells of each sample were injected into channels, aiming to achieve ~3000 cells per channel. Gel Beads-in-Emulsion (GEMs) were formed in channels of a chip in the 10x Chromium instrument and then collected into an Eppendorf plate for GEM reverse transcription (GEM-RT) reaction. After GEM clean up, GEM-RT products were subjected to cDNA amplification for 13 cycles using poly(dT) primers followed by a 3' gene expression library construction using 10X specific primers. (10x Genomics, Pleasanton, CA) and by SPRIselect (Beckman Coulter, Brea, CA) beads clean up. The quality of libraries was examined with a DNA screen tape D5000 on a TapeStation 2200 (Agilent Technologies, Santa Clara, CA, USA), and the quantification was done on the QuBit 3.0 fluorometer (ThermoFisher Scientific, Canada). Subsequently, libraries with unique index were pooled together in equimolar ratio and sequenced for paired-end 100 pb sequencing on a NovaSeq 6000 (Novaseq 6000 S1 reagent kit (200 cycles), Illumina Inc., San Diego, CA, USA) at the Next-Generation Sequencing Platform, Genomics Center, CHU de Québec-Université Laval Research Center, Québec City, Canada. The coverage was approximately 100 million paired-end reads/sample.

scRNAseq data and pathway analysis:

Sequencing data were processed, aligned to the mm10 reference genome, and aggregated into a single file using Cell Ranger v6.0 (10x Genomics) with default settings. This file was examined using Loupe Browser v5.0.1 (10x Genomics) and filtered to remove low-quality cells (i.e., with <1 000 UMIs or >15% of reads from mitochondrial genes) as well as ambiguous cells (i.e., doublets and phagocytosed cells identified based on co-

localized cell-specific markers (*e.g.*, *Hbb-bt*, *C1qa*, *Ly6g*, *Cd3e*, *Cd19*, *Sdc1*, etc.)). A re-analysis following the resulting selection was launched using the reanalyze option from the Cell Ranger software. Downstream analyses were performed on the filtered data reanalyzed with Cell Ranger using R version 4.0.5. The data were first processed by Seurat v.4.04 (40). Data normalization was done with a scale factor of 10000. The identification of the barcodes to the clusters was then imported by the Seurat object. Differential Expression Tests were done using MAST v.1.18. (41). P-values were corrected using the Benjamini-Hochberg method (BH) and filtered with a 5% false discovery rate ($Q < 0.05$). Cell subsets were identified using t-distributed stochastic neighbor embedding (tSNE) distribution and cell type-specific markers. Non-immune cells and contaminant blood cells (4 % of whole scRNA-seq data) were identified and eliminated before further scRNAseq data analysis. Differentially expressed mRNAs were identified by significant feature comparison. A list of 6 neutrophil-related genes common to multiple diseases was used to show the neutrophil-like phenotype of “in transition” microglia/microglia-like cells (42). UMAP dimensional reduction was used to visualize and verify clusters.

Pathway analysis was done using ReactomePA v.1.36. (43) The `enrichPathway` command was used while using the `org.Mm.eg.db` database. Only pathways that showed a P-value of < 0.05 were considered, and the correction was done using BH. Visualization was obtained using the `enrichplot` package v. 1.12.2. and `ggplot2` v.3.3.5. (44, 45)

HSV-1 viral transcripts analysis:

A new reference was created to analyze the viral transcripts by combining the mouse reference (mm10, July 2020) with the genome of herpesvirus 1 strain 17 (Genbank Accession: JN555585). We used `cellranger mkref` (10x Genomics) to create the reference, then used `Cellranger Count` for each sample. The resulting outputs were then used for the `cellranger aggr` command to get an aggregated count matrix and then filtered by the `cellranger reanalyze` command using the chosen barcodes for this study. The resulting filtered count matrix was then exported to Seurat for analysis and visualization.

3.3. Results

Intranasally administered HSV-1 H25 strain is mostly found in the thalamus and hindbrain on day 6 post-infection

We inoculated 6-week-old C57BL/6N mice intranasally with 6×10^5 PFUs of HSV-1 H25 clinical strain. Infected mice developed a swollen forehead as their first clinical sign of the HSE on day 5 p.i. Mortality started to occur on day 6 p.i. (22.8 %), then culminated on day 10 p.i. (41 %). The overall mortality rate was significantly higher in the infected group (59%) than in uninfected mice (0%; $P = 0.02$) (**Fig. 1a**). On day 4 p.i., viral titers in whole brain homogenates became detectable (64 PFUs/mg of the brain). On day 6 (995 PFUs/mg of the brain), they significantly increased and reached the highest levels on day 8 p.i. (1357.5 PFUs/mg of the brain), then started to decrease on day 10 p.i. (662 PFUs/mg of the brain) (**Fig. 1b**).

To determine whether HSV-1 invades the CNS following intranasal infection, we imaged C57BL/6N mice on day 6 after intranasal infection with 6×10^5 PFUs of rHSV-1 expressing Gaussia Luciferase using an intravital imaging system (IVIS) (29). We first noted an ongoing HSV-1 infection in the nasal cavity. Widespread viral dissemination, mainly on the left side of the brain, was observed. The caudal forebrain, midbrain, and hindbrain were the three main regions emitting significant levels of bioluminescence (**Fig. 1c**). Interestingly, the hindbrain signal was more intense than the olfactory bulbs, considered the first region to get infected by HSV-1 in our HSE mouse model. This observation suggests that the thalamic infection occurred earlier than in the other areas, or the immune response in the olfactory bulbs was more effective at controlling the viral infection.

To provide further insights into the HSV-1 dissemination in the CNS, viral titers were next measured in four specific regions of the brain. We found that viral replication occurred mainly in the thalamic-hypothalamic regions (102.3 PFUs/mg of the brain) and hindbrain (66.3 PFUs/mg of the brain) on day 6 p.i. (**Fig. 1d**). Furthermore, we aimed to determine the exact location of HSV-1-infected CNS cells. To do so, we performed IF analyses on coronal and sagittal brain sections obtained from HSV-1-infected mice on day 6 p.i. In concordance with viral titers, the thalamus, hypothalamus, cerebellum, pons, and medulla were highly stained for HSV-1 (**Fig. 1e**). Coronal sections from the same group of infected mice

confirmed that HSV-1⁺ CNS cells were mainly localized in the thalamus, specifically the VPL, a subregion of VPN (**Fig. 1f**). Our results suggest that distinct CNS regions display a differential vulnerability to HSV-1 infection. Based on these findings, we decided to study the highly infected thalamus, especially the VPL, on day 6 p.i.

Reactive microglia are involved in the phagocytosis of HSV-1 infected cells and antigen presentation in moderately infected thalamic regions

To determine the CNS composition of immune cells on days 0 and 6 p.i., we analyzed HSV-1 infected whole brains by flow cytometry. As expected, the only immune cells observed before infection were CD45^{int}CD11b⁺CD115⁺ microglia (**Fig. 2a, top**). On day 6 p.i., however, we observed three other types of leukocytes, i.e., CD45⁺CD11b⁺Ly6C⁺Ly6G⁻ monocytes/macrophages, CD45⁺CD11b⁺CD3ε⁺ T cells and CD45⁺CD11b⁺Ly6G⁺ neutrophils (**Fig. 2a, bottom; Fig. 2b**). Interestingly, the number of microglia-like cells was significantly reduced (**Fig. 2c**, $P = 0.006$), suggesting a possible elimination or phenotypic transformation of reactive microglia during HSE. We conclude that infiltrating immune cells and microglia/microglia-like cells are jointly involved in HSE control.

IF studies were subsequently performed in the infected VPN and its subregion VPL of the thalamus on day 6 p.i. We focused on this thalamic region connecting the trigeminal nerve via the trigeminothalamic tract, which HSV-1 potentially uses to infiltrate the CNS (46). The microglia/microglia-like cell populations were labeled using TMEM119, a well-known microglia marker (47). Qualitative analysis of confocal images of moderately infected thalamus showed that TMEM119⁺ cells underwent morphological alterations such as swollen cell bodies and thicker cytoplasmic processes, compared to surveillant microglia prior to the infection (**Fig. 2d, left and middle**). Besides these hypertrophic/reactive microglia, we also observed important numbers of TMEM119⁺ amoeboid microglia/microglia-like cells, corresponding to a hyperreactive microglial phenotype (**Fig. 2d, middle**). Microglia/microglia-like cells migrated towards HSV-1⁺ cells and were closer to one another in the moderately infected thalamus on day 6 p.i. The increased clustering of microglia/microglia-like cells around infected cells was associated with a decreased microglial density in the surrounding parenchyma (**Fig. 2d, middle and right**). We also found TMEM119⁺ microglia/microglia-like cells expressing the phagolysosomal activity

marker CD68 in moderately infected VPLs, suggesting microglial involvement in viral clearance by phagocytosis of HSV-1⁺ cells. Of note, most CD68⁺ spots were not colocalized within TMEM119⁺ cells, indicating the presence of other phagocytic cells with even higher lysosomal activity in the region (**Fig. 2d, middle**). Some of the hypertrophic/reactive microglia/microglia-like cells closely localized with CD3ε⁺ T cells (**Fig. 2d, right**), suggesting potential antigen uptake and processing for microglial antigen presentation.

To provide additional functional insights into microglial involvement in HSV-1 infected VPL on day 6 p.i., we next performed ultrastructural analysis of microglia using nanoscale-resolution SEM. Microglia were identified based on their well-established distinctive ultrastructural characteristics (48). As this method cannot fully differentiate between microglia and infiltrating monocytes, we refer to the examined cells as microglia/microglia-like cells, as described elsewhere (21). Nanogold staining against HSV-1 (**Fig. 2e-1**) revealed that the virus was mostly located within endosomes containing digested contents (**Fig. 2e-2**) and at the cellular membrane of microglia/microglia-like cells (**Fig. 2e-3**), instead of being detected in the nucleus where the majority of HSV-1 replication takes place (49). This result supports the hypothesis that microglia/microglia-like cells phagocytose HSV-1⁺ cells to limit viral replication.

Microglial functions are impaired in highly infected thalamic regions

We noticed that TMEM119 staining remained present in these regions despite the inflammatory environment (50). These areas were populated by a mixture of hypertrophic and round-shaped microglia/microglia-like cells associated with a reactive state (**Fig. 3a**). Qualitative analysis of highly infected thalamus on day 6 p.i. showed a reduced hypertrophic/reactive microglial density. Most TMEM119⁺ amoeboid microglia/microglia-like cells contacting the infected cells did not express CD68 (**Fig. 2d, 3a**). Despite decreased numbers of TMEM119⁺/CD68⁺ microglia/microglia-like cells, the highly infected thalamus was enriched in CD68⁺ puncta, suggesting that unknown microglial subsets downregulating TMEM119, or other phagocytes compensate for the impaired phagocytic activity of TMEM119⁺ microglia/microglia-like cells (**Fig. 3a**) (51, 52). This CD68 expression was positively correlated with the intensity of the infection. Moreover, detecting HSV-1 signals on TMEM119⁺/CD68⁻ ramified microglia/microglia-like cells raised the intriguing

possibility that these cells could be infected (**Fig. 3a, right**). Our results highlight an exacerbated expression of CD68, mainly found on other cells than TMEM119⁺ microglia/microglia-like cells in the highly infected thalamus.

In parallel, ultrastructural analysis of microglia/microglia-like cells identified based on their ultrastructure (**Fig. 3b-1, 2**) was conducted by quantifying the number of organelles involved in phagolysosomal pathways on SEM images. This analysis revealed that microglia/microglia-like cells possessed a significantly reduced pool of immature lysosomes (also known as early endosomes) in the VPL on day 6 p.i. compared to day 0 (**Fig. 3b-3**, $P < 0.05$), whereas no significant change was seen for other organelles (**Fig. 3b-4, 5; Supp. Fig. 1**, organelles). This observation supports the HSV-1-mediated disruption of microglial phagolysosomal pathways during HSE. Next, we evaluated the interactions that microglia/microglia-like cells established with their microenvironment, including CNS cells such as other microglia/microglia-like cells, neurons, astrocytes, but also their subcellular compartments like myelinated axons, on the same SEM images (**Supp. Fig. 1**, contacts). A reduced number of microglia/microglia-like cells made direct contact with myelinated axons (**Fig. 3b-6**, $P < 0.01$), but also with degraded myelin (**Fig. 3b-7**, $P < 0.05$) in the infected VPL. Taken together, we hypothesize that critical functions of microglia/microglia-like cells, such as the monitoring of neurons and clearance of myelin debris through phagocytosis, were impaired by a highly inflammatory environment in the HSV-1 infected thalamus.

Identification of a novel microglia-like transcriptional signature in HSE

Our scRNA-seq analysis on CD11b⁺ cells isolated from the thalamus on day 6 p.i. provides a broad view of the transcriptional response of CD11b⁺ immune cells involved in the immune response during HSE. We mapped 7658 cells of an aggregated scRNA-seq dataset consisting of five samples. Ten cell populations were identified based on UMAP and cell-specific markers (**Supp. Fig. 2a**), i.e., T cells (*Cd3d*, *Trbc2*, *Trac*), natural killer cells (NK) (*Klra8*, *Klra4*, *Klrb1c*), monocytes (*Sirpb1c*, *Ly6i*, *Apoc2*), dendritic cells (DCs) (*Kmo*, *H2-DMb2*, *Ccr7*), macrophages (mac) (*Pf4*, *Mrc1*, *Cd163*), microglia (*P2ry12*, *Slc2a5*, *Sall3*), pericytes (*Vtn*, *Ndufa4l2*, *Pdgfrb*), ependymal cells (*Ttr*, *Enpp2*, *Ecrge4*), endothelial cells (*Ptprb*, *Ly6c1*, *Cldn5*) and neural cells (*Ptprz1*, *Gpr3711*, *Ntsr2*).

Individually analyzed samples revealed that for each sample, major cell clusters were scattered differentially throughout the two-dimensional UMAP (td-UMAP) representation of aggregated scRNA-seq data (**Fig. 4a**). In parallel, viral titration of the remaining brain samples (brain without thalamus which was dissected for CD11b⁺ cell isolation) showed that each brain exhibited a different viral titer (**Supp. Fig. 3**; Mouse #1: 57.000 PFUs/ μ L, Mouse #2: 98.000 PFUs/ μ L and Mouse #3: 136.000 PFUs/ μ L). We partitioned these immune cells into the following sub-clusters based on the expression of different genes, but also by taking into account different viral titers promoting different levels of inflammation: two monocytes (Mono1 = *Gm34084*, *Clec12a*, *Clec4a1*; Mono2 = *Ms4a8a*, *Arg1*, *Chil3*), two macrophages (reactive mac = *Ccl8*, *Cbr2*, *Cd163*; homeostatic mac = *Pf4*, *Cd209f*, *Mrc1*), three DCs (dendritic cells) (cDC1 (conventional DC) = *Xcr1*, *Snx22*, *Sept3*; cDC2 = *Cacnb3*, *Nudt17*, *Ccr7*; moDC (monocyte-derived dendritic cell) = (*Kmo*, *Ffar2*, *H2-DMb2*) and four microglia (surveillant microglia = *Csmd3*, *P2ry12*, *Gpr34*; reactive microglia = *C4b*, *Cacnals*, *Hspa1b*; reactive proliferating microglia = *Cenpf*, *Pcr1*, *Top2a*; “in transition” microglia/microglia-like cells = *G0s2*, *Il1f9*, *Hdc*) (**Supp. Fig. 3**). Thereafter, another td-UMAP was created to visualize these different cell sub-clusters on the aggregated data (**Fig. 4b**).

We generated a heatmap of the 150 most significantly up- and down-regulated genes to reveal distinct transcriptomic signatures of all sub-clusters. Overall, our clustering approach successfully distinguished the major cell populations and subpopulations with differential gene expression. As expected, we observed sub-clusters exhibiting similar gene expression patterns. Interestingly, Mono2 and “in transition” microglia/microglia-like cells shared a similar transcriptomic pattern, pointing out a possible differentiation between sub-clusters (**Fig. 4c**). Further analysis revealed 104 cells highly enriched (\log_2 fold-change > 8) in neutrophil-related genes. 79 of them belonged to “in transition” microglia/microglia-like cell sub-cluster (Supp. Fig. 2b). Indeed, some well-known genes expressed by neutrophils such as *Retnlg*, *Asprv1*, *Il1f9*, and *Cxcr2* were also found in this novel microglia-like transcriptome (53). We decided to define this cell subtype “microglia-like cells” considering that they highly expressed well-established microglial markers such as *P2ry12*, *Tmem119*, *Fcrls*, and *Csf1r* (**Fig. 4d**). These findings suggest that the “in transition” microglia/microglia-like cell transcriptome whether corresponds to the transcriptomic

signature of a new differentiating microglia-like sub-cluster or to microglia/microglia-like cells phagocytosing infiltrating neutrophils (54, 55).

The “in transition” microglia/microglia-like cell transcriptome is detected in the highly infected thalamus

We individually analyzed the kinetics of immune cells for each of the five scRNA-seq datasets. Two major clusters of uninfected thalami were microglia and mac, corresponding to 72.7 % and 14 % of all cell populations detected in those samples, respectively. We also noticed a decrease of microglia/microglia-like cells (72.7 % vs 40.4 %, P: 0.006) and CNS mac (14 % vs 3.3 %, P: 0.6529) percentages on day 6 p.i., compared to uninfected brains. By contrast, the levels of infiltrating monocytes significantly increased (0.6 % vs 30.6 %, P: 0.0073) on day 6 p.i. Monocytes (30.6 %), T-cells (17.1 %), DCs (4,5 %), and NK cells (2.2 %) were also present in the infected thalamus across the three examined samples, varying in their viral titers (**Fig. 4e**). In concordance with our flow cytometry data showing decreased numbers of microglia/microglia-like cells on day 6 p.i. (**Fig.2c**), the analysis of cell population kinetics using scRNA-seq data also showed a decreased number of microglia/microglia-like cells on day 6 p.i.

Next, we evaluated the numbers of each microglial and monocytic sub-clusters for three infected samples. 259 surveillant and 369 reactive microglia were found in Mouse #1 sample with the lowest brain viral titer. In the same dataset, we identified 115 reactive proliferating microglia and 3 “in transition” microglia/microglia-like cells. Mouse #2, with an intermediate viral titer, had 6 surveillant, 283 reactive, 100 proliferating reactive, and 25 “in transition” microglia/microglia-like cells. Reactive and reactive proliferating microglial sub-clusters, containing respectively 97 and 17 cells, continued to decrease with increased viral titers in Mouse #3 sample. The surveillant microglia sub-cluster completely disappeared, and “in transition” microglia/microglia-like cells reached the highest level with 511 cells in the same dataset (**Fig. 4f**).

We observed high levels of infiltrating monocytes in all three infected mice differing in their viral titers. A total of 198, 64, 16 Mono1 and 65, 213, 798 Mono2 cells were detected in Mouse #1, #2, and #3 datasets, respectively. Mono2 levels increased with the severity of the infection (**Fig. 4f**). We also noticed that their numbers increased along with those of “in

transition” microglia/microglia-like cells. This observation raised the question of whether those microglia/microglia-like cells differentiate from other microglial subsets, or Mono2 gives rise to this ambiguous population. Overall, these observations indicate that increased viral titers alter cell phenotypes and promote an increased “in transition” microglia/microglia-like cell transcriptome in the infected thalamus on day 6 p.i.

The “in transition” microglia/microglia-like cell transcriptome indicates a hyperinflammatory microglial phenotype in highly infected thalamic regions

Monocytes and microglia represent hardly distinguishable cell populations in homeostatic conditions. Inflammation-driven phenotypic alterations of these cells in infectious disease models make their identification even more difficult. To distinguish microglial responses, we identified upregulated cluster-specific genes (\log_2 fold-change>4; $P<0.05$) for infiltrating monocytes, total microglia (surveillant, reactive and reactive proliferating), and “in transition” microglia/microglia-like cells. We included “in transition” microglia/microglia-like cells in this analysis as a major cluster, considering that the origin of these cells is still unknown. The top three most significantly upregulated cluster-specific genes for these three cell populations were: *Sirpb1c*, *Ly6i*, *Apoc2* for infiltrating monocytes, *Csmd3*, *P2ry12*, *Slc2a5* for microglia and *G0s2*, *Il1f9*, *Hdc* for “in transition” microglia/microglia-like cells (**Fig. 5a** (Top 3 genes); **Supp. Fig. 2c** (Top 50 genes)). This analysis allowed the identification of potential biomarkers that could be used to differentiate these clusters.

Furthermore, we performed Panther - Gene Ontology (GO) Enrichment Analysis for molecular functions on “in transition” microglia/microglia-like cell cluster, using all significantly up-regulated genes ($P<0.05$). The analysis revealed the following upregulated GO terms: “Protein homodimerization activity,” “Chemokine receptor binding,” “Cytokine binding,” “Cytokine activity,” “Carbohydrate derivative binding,” “Nucleotide binding,” “GTPase activity,” and “Enzyme binding.” Interestingly, “double-stranded RNA binding” function, regrouping 6 genes (*Ifih1*, *Adar*, *Oas2*, *Oas3*, *Oasl1*, and *Oasl2*) involved in the antiviral response, including IFN downstream signaling, were identified for this microglial sub-cluster (56-58). Indeed, the assessment of differential expression levels of a homemade gene set demonstrated upregulated expression levels of genes encoding antiviral proteins and

IFN-related genes, such as *Isg15*, *Ifi47*, *Irf7*, *Ifit1*, for the “in transition” microglia/microglia-like cells (**Fig. 5b**). These results suggest a direct antiviral response orchestrated by “in transition” microglia/microglia-like cells during HSE.

We performed an exploratory study of biological pathways enriched in infiltrating monocytes and microglial sub-clusters to assess cellular functions using the Reactome Knowledgebase (**Fig. 5c**) (**Supp. Fig. 4** Reactome pathway dot plots and enrichment maps for Mono2 and “in transition” microglia/microglia-like cells) (**Supp. Fig. 5** Functional heat plots for Reactome pathway gene sets) (59). Infiltrating Mono1 up-regulated genes associated to metabolic pathways (*e.g.*, *Atpc1*, *Eif3f*, *Ndufa2*), “Antigen processing-Cross presentation (*e.g.*, *Cyba*, *H2-M3*, *Psm2*) and “Immunoregulatory interactions between a Lymphoid and non-Lymphoid cell” (*e.g.*, *B2m*, *H2-T22*, *Fcgr2*) functions, suggesting an increased capacity for antigen processing and presentation (**Supp. Fig. 4a, 4e; Supp. Fig. 5a**). Mono2 appeared to be one of the main cytokine/chemokine producers (*e.g.*, *CXCL2/10*, *IL-1 α / β* , *IL-15/18/23a/27*) during HSE. We noticed Mono2 activated CLEC7A signaling, which plays a role in the production of TNF, CXCL2, and IL-1 β (60). Amongst several other pathways, “Class I MHC-mediated antigen processing & presentation,” “C-type lectin receptors” (*e.g.*, *C3*, *Clec4n*, *Fcer1g*), and “Fc gamma receptor (FCGR) dependent phagocytosis” (*e.g.*, *Actb*, *Arpc3*, *Fcgr4*, etc.), were up-regulated in Mono2. We also detected upregulation of the “TNFR2 non-canonical NF-KB pathway” (*e.g.*, *Birc3*, *Cd40*, *Nfkb2*) and “Programmed cell death” (*e.g.*, *Bax*, *Bcl2l1*, *Casp3*) for these cells on day 6 p.i. (**Fig. 5c, top; Supp. Fig. 5b**).

Surveillant microglia were enriched in “Signaling by Receptor Tyrosine Kinases” (*e.g.*, *Col27a1*, *Dusp7*, *Insr*), “Signaling by Rho GTPase” (*e.g.*, *Fgd2*, *Rhoq*, *Tuba1a*), and “Platelet activation, signaling and aggregation” (*e.g.*, *Gnal2*, *Mapk14*, *Pic3cg*), “Signaling by VEGF” (*e.g.*, *Ncf2*, *Prkar1a*, *Rock2*) that activates angiogenesis and “Signaling by TGF-beta Receptor Complex” with immunosuppressive functions (**Supp Fig. 4a; Supp. Fig. 5c**). In addition, increased expression of the “FCGR dependent phagocytosis” gene set suggested that surveillant microglia exhibit phagocytic activity while maintaining CNS homeostasis. Reactive microglia activated similar RNA and protein metabolic pathways as found in infiltrating Mono1, *e.g.*, rRNA processing (*e.g.*, *Ddx21*, *Gnl3*, *Nop56*), translation (*e.g.*,

Pabpc1, *Eef1g*, *Rps8*), and non-mediated decay (NMD) (*e.g.*, *Rpl11*, *Rpl12*, *Rpl14*). These cells increased the expression of genes encoding heat-shock proteins (HSPs) (*e.g.*, *Hsp90aa1*, *Hsp90ab1*, *Hspa1a*) involved in the control of oxidative stress, inflammatory response, and antigen presentation (61). Moreover, Endosomal TLR-mediated recognition of HSV-1 seemed to activate these phagocytes that also play a major role in antigen presentation via the major histocompatibility complex (MHC)-I, but also MHC-II (**Supp Fig. 4c; Supp. Fig. 5d**). These results suggest that reactive microglia directly affect CD4⁺ T cell response (62). Our results also confirm that microglia proliferate in the CNS upon viral infection. For these reactive proliferating microglia, we identified mitotic cell division pathways such as “Mitotic Anaphase and Metaphase” (*e.g.*, *Banfl*, *Birc5*, *Anapc5*), “Separation of sister chromatids” (*e.g.*, *Bub1*, *Bub1b*, *Cdc20*), “DNA replication” (*e.g.*, *Dbf4*, *E2f2*, *Gmnn*) and “G2/M checkpoints” (*e.g.*, *Cdk1*, *Exo1*, *Herc2*). We suggest that microgliosis can contribute to the repopulation of these empty niches caused by reactive or dying microglia in the thalamus, although these proliferating microglia exhibiting pro-inflammatory features could also be responsible for the aggravation of the immune response during HSE (**Supp Fig. 4d; Supp. Fig. 5e**).

The analysis of “in transition” microglia/microglia-like cells showed that the most significantly enriched pathway was “Interleukin-1 signaling” (*e.g.*, *Il1a*, *Il1b*, *Il1r2*). These microglia/microglia-like cells were activated via multiple TLRs (*Tlr2/3/4/6/7*). Based on increased expression of *Tram*, *Trif*, and the other genes involved in downstream signaling of TLR4, “TRIF-mediated TLR4 signaling” (*e.g.*, *Birc3*, *Cd14*, *Ikbke*) came up as the major pathway. However, we believe that not only TLR4 but also a multitude of TLRs led to the induction of a hyperinflammatory phenotype producing a variety of cytokines/chemokines exacerbating the inflammatory response (63). This microglial sub-cluster increased the expression of the transcription factor AP-1 (*Jun*), Interferon Regulatory Factors (*Irf1/7/8*), as well as other genes (*Jak1*, *Stat1*, *Stat2*, *cGas*, *Tmem173* (*Sting*), etc.) involved in the IFN-induced JAK-STAT pathway (**Fig. 5c, bottom; Supp. Fig. 4f; Supp. Fig. 5f**). Our results confirm the up-regulation of the “Interferon signaling” (*e.g.*, *Eif2ak2*, *RnaseI*, *Socs3*) pathway, suggesting that these microglia/microglia-like cells play a major role in viral detection and type I IFN production.

“ER-Phagosome pathways” (e.g., *H2-Q10*, *H2-T23*, *B2m*) and “Antigen-presentation via MHC-I” (e.g., *H2-Q6*, *Tap1*, *Tap2*) were activated in “in transition” microglia/microglia-like cells, as well as in reactive microglia and Mono2. Contrarily to other microglia and monocyte sub-clusters, antiviral pathways such as “Antiviral mechanism by IFN-stimulated genes” (e.g., *Arih1*, *Usp18*, *Oasl1*), “DDX58/IFIH1-mediated induction of interferon-alpha/beta” (e.g., *Nfkb1*, *Nfkb2*, *Tax1bp1*), and “ISG15 antiviral mechanism” (e.g., *Isg15*, *Trim25*, *Ube2l6*) were present in the pathway list of “in transition” microglia/microglia-like cells (**Fig. 5c**). They overexpressed dsRNA helicase genes (e.g., *Mda5* (*Ifih*), *Lgp2* (*Dhx58*)), Interferon Stimulated Exonuclease Genes (e.g., *Isg15* and *Isg20*) and other genes encoding antiviral proteins like *Acod1* (Aconitate Decarboxylase 1), *Ifit1* (Interferon-induced protein with tetratricopeptide repeats 1 Gene), *Rsad2* (radical SAM domain-containing, also known as Viperin) and *Hcar2* (Hydroxycarboxylic Acid Receptor 2) (57, 64-68). Based on these highly expressed cytoplasmic antiviral factors, we hypothesize that “in transition” microglia/microglia-like cells with hyperinflammatory features correspond to HSV-1 infected microglia attempting to inhibit viral replication.

We also observed significant enrichment of programmed cell death pathways, including “RIPK1-mediated regulated necrosis” (e.g., *Cflar*, *Fas*, *Mkl1*), “Regulated Necrosis” (e.g., *Pelil1*, *Ripk1*, *Sdcbp*), “Regulation of necroptotic cell death” (e.g., *Birc3*, *Casp8*, *Ube2l6*), for “in transition” microglia/microglia-like cells. In parallel, overexpression of genes (e.g., *Ripk3*, *Fas*, *Tnf*, *Tnfsf10*, *Nlrp3*) involved in TNF and NLR signaling were observed. Overexpressed “casp8 activity is inhibited” in “in transition” microglia/microglia-like cells, suggesting that the blockage of CASP8 activity in the presence of viral FLIP-like protein switches apoptotic signaling to necrotic cell death (69). Additionally, higher expression of *Cflar* (cellular FADD-like interleukin-1 beta converting enzyme (FLICE)-inhibitory protein (cFLIP, encoded by the *Cflar*)) inhibiting apoptosis and promoting necroptosis, strengthens the possibility that “in transition” microglia/microglia-like cells undergo necroptosis.

The “in transition” microglia/microglia-like cell transcriptome corresponds to the antiviral response of HSV-1 infected microglia

To clarify whether “in transition” microglia/microglia-like cells phagocytose infected cells or represent HSV-1 infected microglia, we searched for reads corresponding to the viral transcripts in our scRNA-seq data as described previously (70). Our data showed that few Mono1 and T cells contained viral mRNA. We noticed that Mono2 was highly enriched in viral transcripts. Of note, “in transition” microglia/microglia-like cells exhibited the most elevated levels of HSV-1 transcripts (\log_2 fold-change >5 , **Fig. 6a**). We suggest that similar transcriptomes of “in transition” microglia/microglia-like cells and Mono2 could result from HSV-1 infection activating similar antiviral mechanisms. Altogether, such high levels of viral transcripts suggest a potential viral replication phase for these two clusters.

Furthermore, we characterized HSV-1 infected “in transition” microglia/microglia-like cells by immunofluorescence and confocal microscopy. First, we confirmed that this sub-cluster expressed *Tmem119*, *Iba-1* (*Aif1*), *CD68*, *IL-1 β* , and *Nlrp3* (**Fig. 6b**). IF images revealed that IBA-1⁺/CD68⁺ cells forming clusters became frequent towards highly infected spots, while the number of TMEM119⁺/CD68⁺ cells gradually decreased (**Fig. 6c**, top-left). We further observed ramified TMEM119⁺/IBA-I⁺ microglia/microglia-like cells in the vicinity of highly infected spots (**Fig. 6c**, top-right). In line with transcriptomic results, highly infected spots in the thalamus accommodated TMEM119⁺/NLRP3⁺ and IBA-I⁺/IL-1 β ⁺ ramified cells that potentially correspond to “in transition” microglia/microglia-like cells (**Fig. 6c**, both middle and bottom-left). Additionally, the TMEM119⁺/IBA-I⁺ cells were also HSV-1⁺ (**Fig. 6c**, bottom-right). These overall observations suggest that the few TMEM119⁺/IBA-I⁺ ramified cells localized in highly infected regions of the thalamus correspond to “in transition” microglia/microglia-like cells.

3.4. Discussion

HSE is a rare neurological disorder characterized by CNS inflammation. Numerous cell types, including CNS resident cells and peripheral immune cells, which participate in the immune response against HSV-1, make HSE a complex disease to decipher. Previous studies showed that an early innate immune response has a critical role in controlling HSV-1 infection of the brain (14). However, this early reaction progresses toward an uncontrolled

inflammation, considered harmful, in the late stage of HSE. Microglia, the first immune cell to respond against the infection, represents a potential target for therapeutic interventions. Despite various studies on neuroinfectious diseases, little is known about their roles in HSE. This study sought insights into how microglia react to HSV-1 infection, using a single-cell sequencing approach combined with different complementary microscopy methods.

We first characterized our intranasally-infected HSE mouse model. Following the observation of neurological symptoms, HSE-associated deaths started to occur on day 6 p.i. Further analysis demonstrated that the hindbrain and thalamus were two highly infected regions on day 6 p.i. The VPL was identified as the most infected area of the CNS during the peak of HSE. We studied the microglia/microglia-like cells within highly infected thalamic regions to better understand their contribution to this exacerbated immune response. Our findings reveal that HSV-1 infected microglia/microglia-like cells detect viral presence using cytosolic DNA/RNA sensors, then adopt a hyperactive phenotype producing IL-1 β and TNF- α . These neurotoxic microglia, so-called “in transition” microglia/microglia-like cells found in highly infected thalamus, could accelerate the proinflammatory response and worsen the outcome of HSE.

It is commonly accepted that HSV-1 uses the olfactory nerve to infiltrate the brain following intranasal inoculation. The low detection of HSV-1⁺ cells in olfactory bulbs and tubercles demonstrated that the olfactory route remains a potential pathway for HSV-1 to access the CNS. Unexpectedly, the hindbrain exhibited a more intense bioluminescent signal compared to the olfactory bulbs. This observation suggests that thalamic infection could occur earlier than in other regions, causing higher viral titers. These results also indicate that the neuroepithelium may not be the only route to the CNS for intranasally-inoculated HSV-1. Moreover, the observation of high titers in the VPL, known to be connected to the brainstem trigeminal complex via ventral trigeminal tract major, strengthens the idea that HSV-1 enters the CNS via the projections of trigeminal nerves (71, 72). Taken together, these findings indicate that HSV-1 infiltrates the CNS through multiple ways in our HSE model.

Besides viral replication, HSE is characterized by an important number of infiltrating peripheral immune cells among the CNS. On day 6 p.i., similar percentages of CD45^{high} infiltrating cells and CD45^{low/inter} microglia/microglia-like cells in whole brains highlighted

the contribution of infiltrating immune cells. Increased CD45 expression in microglia has already been detected in several CNS pathologies such as Alzheimer's disease and multiple sclerosis (73). Our scRNA-seq analysis confirmed that infiltrating immune cells expressed similar Ptpc (CD45) levels within all microglial subsets, except for the surveillant microglia found before the infection. Altogether, we think that CD45^{high} CD11b⁺ gating containing phenotypically altered CD45^{high} microglia/microglia-like cells on day 6 p.i. may overestimate the numbers of CD45⁺ infiltrating leukocytes. Monocytes, sharing common properties with microglia, represented one of the two major infiltrating immune cell populations on day 6 p.i. The abundant infiltration of monocytes in the CNS complicated the analysis of microglial response, thus highlighting the importance of identifying cell-specific genes. CD11b⁺CD45⁺Ly6C⁺ gating was used to identify monocyte with flow cytometry. However, we noticed that *Ly6c* was also expressed by "in transition" microglia/microglia-like cells, suggesting that this gating identifies more than monocytes. Highly expressed *CD45* and *Ly6c* by this new microglial sub-cluster highlighted that 1) each marker used to identify an immune cell by flow cytometry should be well characterized and 2) new cell-specific markers are required to better identify immune cells. Based on our findings, *Sirpb1c*, *Ly6i*, and *Apoc2* represent candidate monocyte-specific markers, whereas *Csmd3*, *P2ry12*, and *Slc2a5* are microglia-specific in the context of HSE.

Microglia exert an antiviral effect during CNS infection through their phagocytosis capacity and production of cytokines/chemokines that include type I IFN. Previous studies have shown that the phagocytic uptake of infected cells by reactive microglia is crucial for controlling viral spread (74, 75). Another study reported that microglial depletion resulted in ineffective T cell responses during lethal encephalitis caused by a neurotropic coronavirus (76). In HSE, their absence was associated with a decreased expression of IFN- β and reduced numbers of monocytes and T cells infiltrating the CNS, worsening the outcome of HSE (14). In agreement with these previous studies, our overall analysis demonstrated that TMEM119⁺/CD68⁺ reactive microglia/microglia-like cells were able to fulfill their main functions, such as phagocytosis and antigen presentation, in the thalamus of mice with low viral loads.

The analysis of highly infected thalamic regions further revealed an increased proportion of ameboid microglia/microglia-like cells found in highly inflammatory

environments. Reduced microglial interactions with nodes of Ranvier seems to promote a pro-inflammatory phenotype in spinal cord injury (77). We also demonstrated that HSE-associated microglia/microglia-like cells decreased their number of contacts with myelinated axons and degraded myelin, supporting the potential acquisition of a pro-inflammatory phenotype. Contrarily to microglia found in most viral encephalitis, these extremely reactive microglia lost CD68 expression among regions with high viral loads (78). In line with the low levels of CD68 expression in reactive microglia, ultrastructural analysis of the VPL revealed reduced numbers of immature lysosomes in microglia/microglia-like cells, indicating disrupted phagolysosome pathways. The decrease in immature lysosomes, already reported in neurodegenerative pathologies, may also be explained by the potential fusion of these structures within the Golgi compartment during viral assembly, suggesting that these microglia/microglia-like cells are infected with HSV-1 (79). Interestingly, we observed an important number of CD68⁺ puncta located outside microglia/microglia-like cells in the highly infected thalamus, emphasizing the involvement of other phagocytes compensating for impaired microglial phagocytosis (51, 80). Taken together, these findings suggest that the exacerbated inflammatory response in the highly infected thalamus impaired microglial functions. At the same time, microglia/microglia-like cells exhibited a protective role in the moderately-infected thalamus.

The transcriptomic signatures of immune cells, including microglia, were assessed using a single-cell sequencing approach. Four microglial sub-clusters were identified from our aggregated scRNA-seq data. Surveillant, reactive, and reactive proliferating microglia expressing microglial signature genes were located close to one another on the t-d-UMAP distribution. Surprisingly, we observed another cell cluster closer to Mono2, which only appeared in the infected samples. The frequency of these cells increased progressively with the viral titers, indicating their association with the severity of infection. We conclude that these cells arose from microglia, considering their high expression levels of microglial signature genes. They were thus named “in transition” microglia/microglia-like cells. We initially thought that this new population connecting the transcriptomes of both Mono2 and reactive microglia might correspond to a new transition state of infiltrating monocytes differentiating into microglia-like cells. The simultaneous increase of infiltrating monocytes and decrease of CD45^{low/inter} microglia/microglia-like cells strengthens the hypothesis that

microglia acquire a Mono2-like transcriptome. Monocyte-to-microglia/microglia-like cells transition was studied in various CNS pathologies, in which monocytes become microglia-like cells (20). Some studies claimed that during viral encephalitis, infiltrating Ly6C⁺ monocytes do not give rise to microglia (24). Further investigations are needed to understand if the “in transition” microglia/microglia-like cell represents a transitional Mono2/microglia phenotype in HSE. Based on our observations, we suggest that HSV-1 infection results in a convergent transcriptional response for infiltrating monocytes and resident microglia. Taken together, we conclude that “in transition” microglia/microglia-like cells correspond to an antiviral state.

To better understand their role in HSE, we next investigated molecular pathways of microglia/microglia-like cells and monocytes. Reactive microglia up-regulated nonsense-mediated mRNA decay pathway involved in the degradation of viral mRNAs. The viral replication modulating effect of the NMD pathway has already been demonstrated in murine hepatitis virus and Kaposi’s sarcoma-associated herpesvirus infections (81, 82). These reactive microglia also actively contributed to antigen presentation. Conversely, Mono1 expressing *H2-Eb1*, *H2-Aa*, and *H2-Ab1* may be more crucial in triggering adaptive responses than reactive microglia. These findings raise the intriguing possibility that CCR2⁺ Mono1 infiltrated the infected CNS, then acquired a Mono2 phenotype with increased antiviral features by up-regulating genes encoding cytokines/chemokines and other antiviral effectors (83). These cells represent one of the two HSV-1 mRNA enriched cell types. Further analysis suggested that “in transition” microglia/microglia-like cells were infected by HSV-1. In addition to the detection of viral mRNA in these cells, IF analysis showed that HSV-1 antibodies stained the entire cell instead of phagosomes containing infected cell debris (14, 78). Overall, gene profiling indicates that “in transition” microglia/microglia-like cells detect the dsRNA of HSV-1 via RIG-I (retinoic acid-inducible gene I, also known as DDX58)/MDA5 in the cytosol, resulting in type I IFN production and NLRP3 inflammasome-mediated IL-1 β secretion (84, 85). In concordance with an increased pro-inflammatory profile, accelerated microglial exosome release may result in decreased early endosome numbers in reactive microglia during HSE (86). These pro-inflammatory TMEM119⁺/IBA-I⁺ “in transition” microglia/microglia-like cells can activate NLRP3-inflammasome-mediated IL-1 β production in the infected thalamus. A recent study revealed

that inflammasome response to HSV is primarily mediated by microglia and contributes to mortality independent of controlling viral replication (87). Similar to our novel HSE-associated microglial transcriptomic findings, a novel subset of high-grade glioma-associated microglia exhibiting inflammasome-mediated pro-inflammatory and proliferative signatures has been recently described (88). Another study reported that neurotoxic CCR9⁺ACOD1⁺ microglia producing high levels of TNF- α was observed in the CNS of mice infected with neurotrophic pathogens. As observed in “in transition” microglia/microglia-like cells, highly expressed *Acod1* was associated with neurotoxic microglia, which were resistant to apoptosis and associated with chronic neuroinflammation (66, 89). “In transition” microglia/microglia-like cells exhibited a swollen but ramified morphology, called hypertrophic, contrary to other hyperactive amoeboid microglia/microglia-like cells found in the highly infected thalamus. In accordance with the cytoplasmic swelling observed during necroptosis, pathway analysis also suggested the activation of TNF signaling and necroptotic cell death (90, 91). Activated programmed cell death pathways in “in transition” microglia/microglia-like cells could explain the up-regulation of neutrophil-related genes. Further studies are required to clarify whether “in transition” microglia/microglia-like cells undergo necroptosis or are involved in the phagocytic removal of necroptotic neutrophils to prevent them from releasing their cytotoxic content (92). Following the exposure to strong immune-stimulatory signals, microglia/microglia-like cells undergo apoptotic cell death to preserve brain tissue from the damaging effect caused by long-term activation of these cells in the HSV-1 infected brain (93). However, viral RIR1 interaction with RIPK1, RIPK3, and CASP8 seemed to block apoptosis and prevented TNF-induced necroptosis in infected human cells (93-95). We suggest that blocking cell death by HSV-1 infection could result in a persistent “in transition” microglia/microglia-like state producing pro-inflammatory mediators (96).

In summary, we showed that although microglia/microglia-like cells could exert a beneficial role in the early stage of HSV-1 infection, the same cells could alter their functions and have detrimental effects throughout HSE (97). Our study uncovered a novel transcriptional response of microglia/microglia-like cells during HSE while exploring the functions exhibited by different microglial states. Nonetheless, our study has some limitations. To validate that HSV-1 RNA and proteins detected “in transition” microglia/microglia-like cells, are originated from a productive infection and not from

phagocytosed HSV-1⁺ cells, another approach like single nucleus RNA sequencing should be performed. Our conclusions about the morphology, density, and distribution of microglia/microglia-like cells and other immune cells should be carefully interpreted since we did not perform a quantitative analysis of IF images. Another limitation is the low number of samples for scRNA-seq, which could mislead the interpretations of our transcriptomic data. Further studies with larger number of mice and time points would allow to confirm our observations. We could also not compare our RNA sequencing results between the three infected samples, initially designed as biological replicates, because of differences in brain viral titers. On the other side, analyzing microglia/microglia-like cells exposed to different viral loads allowed us to study diverse states of these cells and to characterize transcriptomic responses of infected “in transition” microglia/microglia-like cells. Our RNA-seq data provide a resource for future investigations of the roles of microglia/microglia-like cells in HSE.

3.5. Conclusion

We suggest that distinct “in transition” microglia/microglia-like cells represent an important player leading to an exacerbated pro-inflammatory response and could thus become a promising target to modulate neuroinflammation.

Availability of data and materials

The scRNA-seq datasets and SEM images that support the findings of this study are available upon reasonable request from the corresponding author.

Abbreviations

BH: Benjamini-Hochberg method; cDC: Conventional dendritic cell; CNS: Central nervous system; DC: Dendritic cell; DPBS: Dulbecco's phosphate-buffered saline; EDTA: Ethylenediaminetetraacetic acid; GEM-RT: Gel Beads-in-Emulsion reverse transcription; GEM: Gel Beads-in-Emulsion; GO: Gene Ontology; HSE: Herpes simplex encephalitis; HSP: Heat-shock protein; HSV-1: Herpes simplex virus 1; IF: Immunofluorescence; IFN: Interferon; IRF: Interferon Regulatory Factors; IVIS: Intravital imaging system; KPBS:

Potassium-phosphate buffered saline; Mac: macrophage; MACS: Magnetic-activated cell sorting; MHC: Major histocompatibility complex; Mono: Monocyte; NK: Natural killer; NMD: Non-mediated decay; NO: Nitric oxide; p.i.: post-infection; PB: Phosphate buffer; PBS: Phosphate-buffered saline; pDC: Plasmacytoid dendritic cells; PFA: Paraformaldehyde; rHSV-1: recombinant herpes simplex virus 1; ROS: Reactive oxygen species; RT: Room temperature; scRNA-seq: Single-cell RNA sequencing; SEM: Scanning electronic microscopy; td-UMAP: Two-dimensional uniform manifold approximation and projection; tSNE: t-distributed stochastic neighbor embedding; UMAP: Uniform manifold approximation and projection; VPL: Ventral posterolateral nucleus; VPN: Ventral posterior nucleus

Acknowledgments

We want to thank Stéphane Dubois, Annie-Claude Collin-Deschesnes and Dr. Martine Dumont from the genomics center for sample management and skillful technical assistance, Julie-Christine Levesque for her technical assistance with confocal microscopy, Dr. Emilie Pic from Dr. Jacques Corbeil lab for her contributions to the coordination of this study, Dr. Elsa Rousseau for her technical advises, Dr. Marc Bazin from Dr. Girish Shah lab for his technical support in IVIS Lumina III (PerkinElmer); all are located at the CHU de Québec-Laval University Research Center.

Funding

Two grants from the Canadian Institutes of Health Research (grant no. 148361 to G.B. and grant no. 143279 to J.C.) supported this study. G.B. is the holder of the Canada Research Chair (CRC) on emerging viruses and antiviral resistance and MET of the CRC in Neurobiology of Aging and Cognition, J.C. holds a CRC in Medical Genomics (950-231574). FGI is a holder of a doctoral scholarship by the Mexican Council of Science and Technology (CONACYT). MB was a holder of the doctoral FRQS award during part of this study.

Contributions

O.U., M.B., L.V. M.E.T., J.C., and G.B. conceived and designed this study; O.U., J.M.D., M.B., L.L, F.G.I., and L.V. performed research; O.U., J.M.D., L.V., and M.B.

analyzed the data; O.U., J.M.D., M.B. and L.V. prepared the figures; O.U., M.B., J.M.D., M.E.T., and G.B. wrote the paper. All authors reviewed and approved the manuscript.

Ethics declarations

Ethics approval and consent to participate

All animals were used in accordance with the Canadian Council on Animal Care guidelines, and the protocol was approved by the Animal Care Ethics Committee of Laval University (protocol no. 2017072).

Consent for publication

Not applicable.

Competing interests

The authors declare no competing interests.

3.6. References

1. Whitley RJ, Kimberlin DW, Roizman B. Herpes simplex viruses. *Clin Infect Dis*. 1998;26(3):541-53; quiz 54-5.
2. Held K, Derfuss T. Control of HSV-1 latency in human trigeminal ganglia--current overview. *J Neurovirol*. 2011;17(6):518-27.
3. Arduino PG, Porter SR. Herpes Simplex Virus Type 1 infection: overview on relevant clinico-pathological features. *J Oral Pathol Med*. 2008;37(2):107-21.
4. Bradshaw MJ, Venkatesan A. Herpes Simplex Virus-1 Encephalitis in Adults: Pathophysiology, Diagnosis, and Management. *Neurotherapeutics*. 2016;13(3):493-508.
5. Gnann JW, Jr., Whitley RJ. Herpes Simplex Encephalitis: an Update. *Curr Infect Dis Rep*. 2017;19(3):13.
6. Piret J, Boivin G. Innate immune response during herpes simplex virus encephalitis and development of immunomodulatory strategies. *Rev Med Virol*. 2015;25(5):300-19.
7. Prinz M, Jung S, Priller J. Microglia Biology: One Century of Evolving Concepts. *Cell*. 2019;179(2):292-311.
8. Nayak D, Roth TL, McGavern DB. Microglia development and function. *Annu Rev Immunol*. 2014;32:367-402.
9. Tay TL, Savage JC, Hui CW, Bisht K, Tremblay ME. Microglia across the lifespan: from origin to function in brain development, plasticity and cognition. *J Physiol*. 2017;595(6):1929-45.
10. Masuda T, Sankowski R, Staszewski O, Prinz M. Microglia Heterogeneity in the Single-Cell Era. *Cell Rep*. 2020;30(5):1271-81.
11. Chen Z, Zhong D, Li G. The role of microglia in viral encephalitis: a review. *J Neuroinflammation*. 2019;16(1):76.
12. Wang Y, Jia J, Wang Y, Li F, Song X, Qin S, et al. Roles of HSV-1 infection-induced microglial immune responses in CNS diseases: friends or foes? *Crit Rev Microbiol*. 2019;45(5-6):581-94.
13. Reinert LS, Lopusna K, Winther H, Sun C, Thomsen MK, Nandakumar R, et al. Sensing of HSV-1 by the cGAS-STING pathway in microglia orchestrates antiviral defence in the CNS. *Nat Commun*. 2016;7:13348.

14. Uyar O, Laflamme N, Piret J, Venable MC, Carbonneau J, Zarrouk K, et al. An Early Microglial Response Is Needed To Efficiently Control Herpes Simplex Virus Encephalitis. *J Virol*. 2020;94(23).
15. Gomes-Leal W. Microglial physiopathology: how to explain the dual role of microglia after acute neural disorders? *Brain Behav*. 2012;2(3):345-56.
16. 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.
17. Hatton CF, Duncan CJA. Microglia Are Essential to Protective Antiviral Immunity: Lessons From Mouse Models of Viral Encephalitis. *Front Immunol*. 2019;10:2656.
18. 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;98(3):447-60.
19. 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.
20. Chen HR, Sun YY, Chen CW, Kuo YM, Kuan IS, Tiger Li ZR, et al. Fate mapping via CCR2-CreER mice reveals monocyte-to-microglia transition in development and neonatal stroke. *Sci Adv*. 2020;6(35):eabb2119.
21. Lund H, Pieber M, Parsa R, Han J, Grommisch D, Ewing E, et al. Competitive repopulation of an empty microglial niche yields functionally distinct subsets of microglia-like cells. *Nat Commun*. 2018;9(1):4845.
22. Gosselin D, Link VM, Romanoski CE, Fonseca GJ, Eichenfield DZ, Spann NJ, et al. Environment drives selection and function of enhancers controlling tissue-specific macrophage identities. *Cell*. 2014;159(6):1327-40.
23. Boivin N, Menasria R, Gosselin D, Rivest S, Boivin G. Impact of deficiency in CCR2 and CX3CR1 receptors on monocytes trafficking in herpes simplex virus encephalitis. *J Gen Virol*. 2012;93(Pt 6):1294-304.
24. 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.

25. Varvel NH, Neher JJ, Bosch A, Wang W, Ransohoff RM, Miller RJ, et al. Infiltrating monocytes promote brain inflammation and exacerbate neuronal damage after status epilepticus. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2016;113(38):E5665-74.
26. Papalexli E, Satija R. Single-cell RNA sequencing to explore immune cell heterogeneity. *Nat Rev Immunol*. 2018;18(1):35-45.
27. Stephenson E, Reynolds G, Botting RA, Calero-Nieto FJ, Morgan MD, Tuong ZK, et al. Single-cell multi-omics analysis of the immune response in COVID-19. *Nat Med*. 2021;27(5):904-16.
28. Wang Q, Peng C, Yang M, Huang F, Duan X, Wang S, et al. Single-cell RNA-seq landscape midbrain cell responses to red spotted grouper nervous necrosis virus infection. *PLoS Pathog*. 2021;17(6):e1009665.
29. Uyar O, Plante PL, Piret J, Venable MC, Carbonneau J, Corbeil J, et al. A novel bioluminescent herpes simplex virus 1 for in vivo monitoring of herpes simplex encephalitis. *Sci Rep*. 2021;11(1):18688.
30. 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. *J Infect Dis*. 2007;196(6):853-60.
31. Peters A, Palay SL, Webster Hd, editors. *The Fine Structure of the Nervous System: Neurons and Their Supporting Cells*1991.
32. St-Pierre MK, Bordeleau M, Tremblay ME. Visualizing Dark Microglia. *Methods Mol Biol*. 2019;2034:97-110.
33. De Duve C. The lysosome. *Sci Am*. 1963;208:64-72.
34. Holtzman E, Novikoff AB, Villaverde H. Lysosomes and GERL in normal and chromatolytic neurons of the rat ganglion nodosum. *J Cell Biol*. 1967;33(2):419-35.
35. Nandy K. Properties of neuronal lipofuscin pigment in mice. *Acta Neuropathol*. 1971;19(1):25-32.
36. Chavez-Valdez R, Flock DL, Martin LJ, Northington FJ. Endoplasmic reticulum pathology and stress response in neurons precede programmed necrosis after neonatal hypoxia-ischemia. *Int J Dev Neurosci*. 2016;48:58-70.
37. Long Q, Zhao D, Fan W, Yang L, Zhou Y, Qi J, et al. Modeling of Mitochondrial Donut Formation. *Biophys J*. 2015;109(5):892-9.

38. Haka AS, Barbosa-Lorenzi VC, Lee HJ, Falcone DJ, Hudis CA, Dannenberg AJ, et al. Exocytosis of macrophage lysosomes leads to digestion of apoptotic adipocytes and foam cell formation. *J Lipid Res.* 2016;57(6):980-92.
39. Maxfield FR, Barbosa-Lorenzi VC, Singh RK. Digestive exophagy: Phagocyte digestion of objects too large for phagocytosis. *Traffic.* 2020;21(1):6-12.
40. Hao Y, Hao S, Andersen-Nissen E, Mauck WM, 3rd, Zheng S, Butler A, et al. Integrated analysis of multimodal single-cell data. *Cell.* 2021;184(13):3573-87 e29.
41. Finak G, McDavid A, Yajima M, Deng J, Gersuk V, Shalek AK, et al. MAST: a flexible statistical framework for assessing transcriptional changes and characterizing heterogeneity in single-cell RNA sequencing data. *Genome Biology.* 2015;16(1):278.
42. Garratt LW. Current Understanding of the Neutrophil Transcriptome in Health and Disease. *Cells.* 2021;10(9).
43. Yu G, He QY. ReactomePA: an R/Bioconductor package for reactome pathway analysis and visualization. *Mol Biosyst.* 2016;12(2):477-9.
44. Wickham H. *ggplot2: Elegant Graphics for Data Analysis*: Springer-Verlag New York; 2016.
45. Yu G. *enrichplot: Visualization of Functional Enrichment Result* 2021.
46. Boukhvalova MS, Mortensen E, Mbaye A, Lopez D, Kastrukoff L, Blanco JCG. Herpes Simplex Virus 1 Induces Brain Inflammation and Multifocal Demyelination in the Cotton Rat *Sigmodon hispidus*. *J Virol.* 2019;94(1).
47. Gonzalez Ibanez F, Picard K, Bordeleau M, Sharma K, Bisht K, Tremblay ME. Immunofluorescence Staining Using IBA1 and TMEM119 for Microglial Density, Morphology and Peripheral Myeloid Cell Infiltration Analysis in Mouse Brain. *J Vis Exp.* 2019(152).
48. Nahirney PC, Tremblay ME. Brain Ultrastructure: Putting the Pieces Together. *Front Cell Dev Biol.* 2021;9:629503.
49. Packard JE, Dembowski JA. HSV-1 DNA Replication-Coordinated Regulation by Viral and Cellular Factors. *Viruses.* 2021;13(10).
50. Bennett ML, Bennett FC, Liddel SA, Ajami B, Zamanian JL, Fernhoff NB, et al. New tools for studying microglia in the mouse and human CNS. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2016;113(12):E1738-46.

51. Konishi H, Okamoto T, Hara Y, Komine O, Tamada H, Maeda M, et al. Astrocytic phagocytosis is a compensatory mechanism for microglial dysfunction. *EMBO J*. 2020;39(22):e104464.
52. Fu R, Shen Q, Xu P, Luo JJ, Tang Y. Phagocytosis of microglia in the central nervous system diseases. *Mol Neurobiol*. 2014;49(3):1422-34.
53. Whittaker Hawkins RF, Patenaude A, Dumas A, Jain R, Tesfagiorgis Y, Kerfoot S, et al. ICAM1+ neutrophils promote chronic inflammation via ASPRV1 in B cell-dependent autoimmune encephalomyelitis. *JCI Insight*. 2017;2(23).
54. Otxoa-de-Amezaga A, Miro-Mur F, Pedragosa J, Gallizioli M, Justicia C, Gaja-Capdevila N, et al. Microglial cell loss after ischemic stroke favors brain neutrophil accumulation. *Acta Neuropathol*. 2019;137(2):321-41.
55. Neumann J, Sauerzweig S, Ronicke R, Gunzer F, Dinkel K, Ullrich O, et al. Microglia cells protect neurons by direct engulfment of invading neutrophil granulocytes: a new mechanism of CNS immune privilege. *J Neurosci*. 2008;28(23):5965-75.
56. Choi UY, Kang JS, Hwang YS, Kim YJ. Oligoadenylate synthase-like (OASL) proteins: dual functions and associations with diseases. *Exp Mol Med*. 2015;47:e144.
57. Dias Junior AG, Sampaio NG, Rehwinkel J. A Balancing Act: MDA5 in Antiviral Immunity and Autoinflammation. *Trends Microbiol*. 2019;27(1):75-85.
58. Pfaller CK, George CX, Samuel CE. Adenosine Deaminases Acting on RNA (ADARs) and Viral Infections. *Annu Rev Virol*. 2021;8(1):239-64.
59. Griss J, Viteri G, Sidiropoulos K, Nguyen V, Fabregat A, Hermjakob H. ReactomeGSA - Efficient Multi-Omics Comparative Pathway Analysis. *Mol Cell Proteomics*. 2020;19(12):2115-25.
60. Brown GD, Herre J, Williams DL, Willment JA, Marshall AS, Gordon S. Dectin-1 mediates the biological effects of beta-glucans. *J Exp Med*. 2003;197(9):1119-24.
61. Dukay B, Csoboz B, Toth ME. Heat-Shock Proteins in Neuroinflammation. *Front Pharmacol*. 2019;10:920.
62. Gonzalez H, Pacheco R. T-cell-mediated regulation of neuroinflammation involved in neurodegenerative diseases. *J Neuroinflammation*. 2014;11:201.

63. Voet S, Mc Guire C, Hagemeyer N, Martens A, Schroeder A, Wieghofer P, et al. A20 critically controls microglia activation and inhibits inflammasome-dependent neuroinflammation. *Nat Commun.* 2018;9(1):2036.
64. Takahashi T, Nakano Y, Onomoto K, Yoneyama M, Ui-Tei K. LGP2 virus sensor enhances apoptosis by upregulating apoptosis regulatory genes through TRBP-bound miRNAs during viral infection. *Nucleic Acids Res.* 2020;48(3):1494-507.
65. Yang E, Li MMH. All About the RNA: Interferon-Stimulated Genes That Interfere With Viral RNA Processes. *Front Immunol.* 2020;11:605024.
66. Wu R, Chen F, Wang N, Tang D, Kang R. ACOD1 in immunometabolism and disease. *Cell Mol Immunol.* 2020;17(8):822-33.
67. Jang JS, Lee JH, Jung NC, Choi SY, Park SY, Yoo JY, et al. Rsd2 is necessary for mouse dendritic cell maturation via the IRF7-mediated signaling pathway. *Cell Death Dis.* 2018;9(8):823.
68. Ma X, Luo X, Zhou S, Huang Y, Chen C, Huang C, et al. Hydroxycarboxylic Acid Receptor 2 Is a Zika Virus Restriction Factor That Can Be Induced by Zika Virus Infection Through the IRE1-XBP1 Pathway. *Front Cell Infect Microbiol.* 2019;9:480.
69. Sawai H. Differential effects of caspase inhibitors on TNF-induced necroptosis. *Biochem Biophys Res Commun.* 2013;432(3):451-5.
70. Sun J, Vera JC, Drnevich J, Lin YT, Ke R, Brooke CB. Single cell heterogeneity in influenza A virus gene expression shapes the innate antiviral response to infection. *PLOS Pathogens.* 2020;16(7):e1008671.
71. Bechara A, Laumonnerie C, Vilain N, Kratochwil CF, Cankovic V, Maiorano NA, et al. Hoxa2 Selects Barrelette Neuron Identity and Connectivity in the Mouse Somatosensory Brainstem. *Cell Rep.* 2015;13(4):783-97.
72. Killackey HP, Fleming K. The role of the principal sensory nucleus in central trigeminal pattern formation. *Brain Res.* 1985;354(1):141-5.
73. Walker DG, Lue LF. Immune phenotypes of microglia in human neurodegenerative disease: challenges to detecting microglial polarization in human brains. *Alzheimers Res Ther.* 2015;7(1):56.

74. Rock RB, Gekker G, Hu S, Sheng WS, Cheeran M, Lokensgard JR, et al. Role of microglia in central nervous system infections. *Clin Microbiol Rev.* 2004;17(4):942-64, table of contents.
75. Fekete R, Cserep C, Lenart N, Toth K, Orsolits B, Martinecz B, et al. Microglia control the spread of neurotropic virus infection via P2Y₁₂ signalling and recruit monocytes through P2Y₁₂-independent mechanisms. *Acta Neuropathol.* 2018;136(3):461-82.
76. Wheeler DL, Sariol A, Meyerholz DK, Perlman S. Microglia are required for protection against lethal coronavirus encephalitis in mice. *J Clin Invest.* 2018;128(3):931-43.
77. Ronzano R, Roux T, Thetiot M, Aigrot MS, Richard L, Lejeune FX, et al. Microglia-neuron interaction at nodes of Ranvier depends on neuronal activity through potassium release and contributes to remyelination. *Nat Commun.* 2021;12(1):5219.
78. Enlow W, Bordeleau M, Piret J, Ibanez FG, Uyar O, Venable MC, et al. Microglia are involved in phagocytosis and extracellular digestion during Zika virus encephalitis in young adult immunodeficient mice. *J Neuroinflammation.* 2021;18(1):178.
79. Scherer KM, Manton JD, Soh TK, Mascheroni L, Connor V, Crump CM, et al. A fluorescent reporter system enables spatiotemporal analysis of host cell modification during herpes simplex virus-1 replication. *J Biol Chem.* 2021;296:100236.
80. Ritzel RM, Patel AR, Grenier JM, Crapser J, Verma R, Jellison ER, et al. Functional differences between microglia and monocytes after ischemic stroke. *J Neuroinflammation.* 2015;12:106.
81. Zhao Y, Ye X, Shehata M, Dunker W, Xie Z, Karijolich J. The RNA quality control pathway nonsense-mediated mRNA decay targets cellular and viral RNAs to restrict KSHV. *Nat Commun.* 2020;11(1):3345.
82. Wada M, Lokugamage KG, Nakagawa K, Narayanan K, Makino S. Interplay between coronavirus, a cytoplasmic RNA virus, and nonsense-mediated mRNA decay pathway. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2018;115(43):E10157-E66.
83. Sang Y, Miller LC, Blecha F. Macrophage Polarization in Virus-Host Interactions. *J Clin Cell Immunol.* 2015;6(2).
84. Onomoto K, Onoguchi K, Yoneyama M. Regulation of RIG-I-like receptor-mediated signaling: interaction between host and viral factors. *Cell Mol Immunol.* 2021;18(3):539-55.

85. Schlee M, Hartmann G. Discriminating self from non-self in nucleic acid sensing. *Nat Rev Immunol*. 2016;16(9):566-80.
86. Guo M, Hao Y, Feng Y, Li H, Mao Y, Dong Q, et al. Microglial Exosomes in Neurodegenerative Disease. *Front Mol Neurosci*. 2021;14:630808.
87. Hayes CK, Wilcox DR, Yang Y, Coleman GK, Brown MA, Longnecker R. ASC-dependent inflammasomes contribute to immunopathology and mortality in herpes simplex encephalitis. *PLoS Pathog*. 2021;17(2):e1009285.
88. Liu H, Sun Y, Zhang Q, Jin W, Gordon RE, Zhang Y, et al. Pro-inflammatory and proliferative microglia drive progression of glioblastoma. *Cell Rep*. 2021;36(11):109718.
89. Li H, Gang Z, Yuling H, Luokun X, Jie X, Hao L, et al. Different neurotropic pathogens elicit neurotoxic CCR9- or neurosupportive CXCR3-expressing microglia. *J Immunol*. 2006;177(6):3644-56.
90. Frank D, Vince JE. Pyroptosis versus necroptosis: similarities, differences, and crosstalk. *Cell Death Differ*. 2019;26(1):99-114.
91. Yu Z, Jiang N, Su W, Zhuo Y. Necroptosis: A Novel Pathway in Neuroinflammation. *Front Pharmacol*. 2021;12:701564.
92. Wang X, Yousefi S, Simon HU. Necroptosis and neutrophil-associated disorders. *Cell Death Dis*. 2018;9(2):111.
93. Reinert LS, Rashidi AS, Tran DN, Katzilieris-Petras G, Hvidt AK, Gohr M, et al. Brain immune cells undergo cGAS/STING-dependent apoptosis during herpes simplex virus type 1 infection to limit type I IFN production. *J Clin Invest*. 2021;131(1).
94. Duarte LF, Farias MA, Alvarez DM, Bueno SM, Riedel CA, Gonzalez PA. Herpes Simplex Virus Type 1 Infection of the Central Nervous System: Insights Into Proposed Interrelationships With Neurodegenerative Disorders. *Front Cell Neurosci*. 2019;13:46.
95. Guo H, Omoto S, Harris PA, Finger JN, Bertin J, Gough PJ, et al. Herpes simplex virus suppresses necroptosis in human cells. *Cell Host Microbe*. 2015;17(2):243-51.
96. Nailwal H, Chan FK. Necroptosis in anti-viral inflammation. *Cell Death Differ*. 2019;26(1):4-13.
97. Marocci ME, Napoletani G, Protto V, Kolesova O, Piacentini R, Li Puma DD, et al. Herpes Simplex Virus-1 in the Brain: The Dark Side of a Sneaky Infection. *Trends Microbiol*. 2020;28(10):808-20.

Figures:

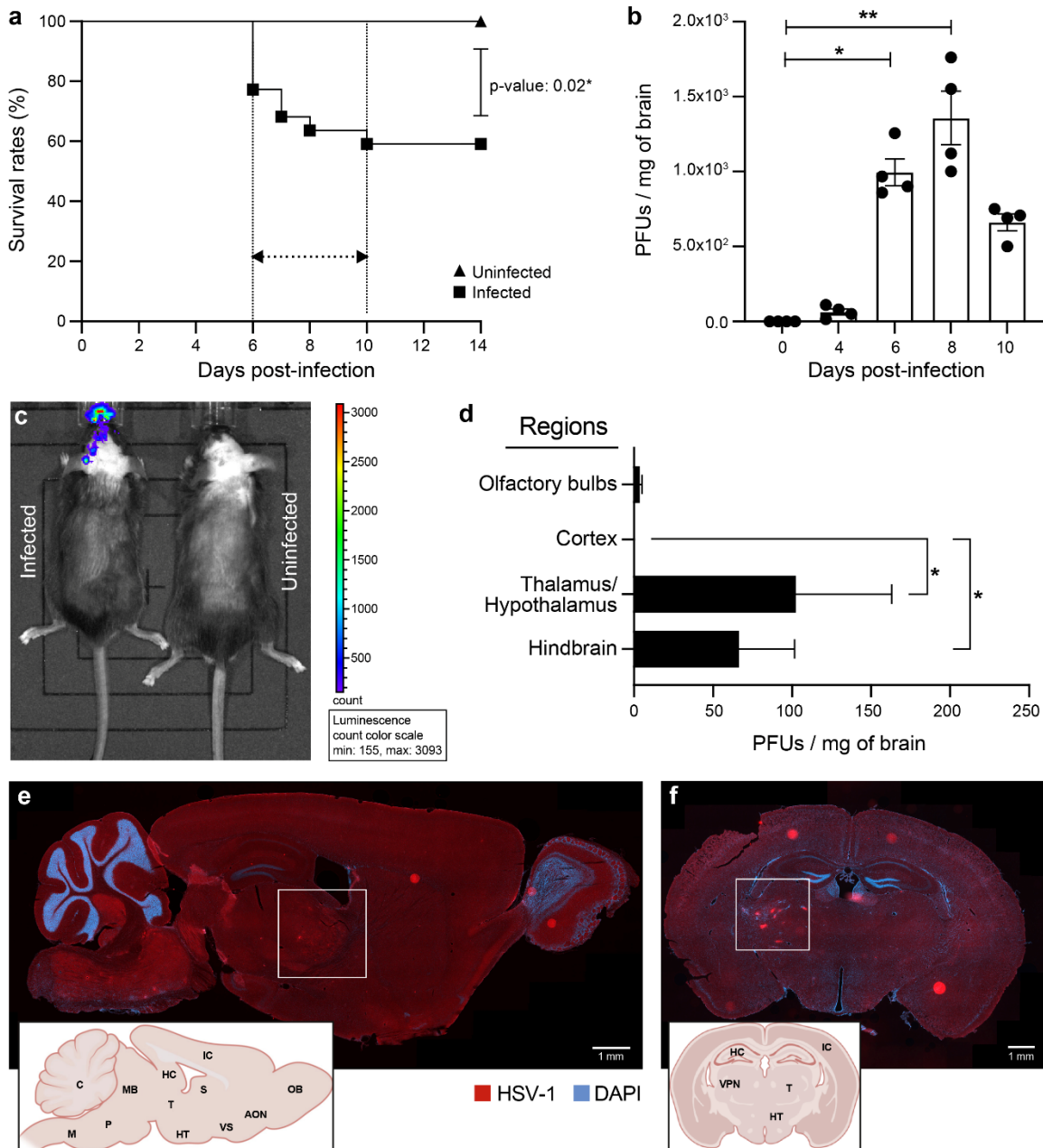


Figure 1: HSV-1 replication in thalamus and hindbrain leads to increased mortality on day 6 p.i. 6-week-old C57BL/6N male mice (n = 12 mice) were intranasally infected with 6×10^5 PFUs of HSV-1 strain H25 in 20 μ l MEM. (a) Survival curves of HSV-1 infected vs uninfected control mice. Survival rates were analyzed using a log-rank (Mantel-Cox) test. (b) Viral titers in homogenates of brains were measured by a standard plaque assay on Vero cells on days 0, 4 and 6 p.i.. The results are reported as PFUs per milligram (mg) of brain

homogenates and represent the means \pm SEM for 4 mice per group at each time point. (c) A representative bioluminescence image of mouse infected with 6×10^5 PFUs of recombinant HSV-1 (rHSV-1) on the left and uninfected control mouse on the right side, on day 6 p.i. The bioluminescent signal is expressed in average radiance (p/s/cm²/sr). (d) Identification of HSV-1⁺ brain regions on day 6 p.i. Viral titers in homogenates of different brain regions were measured by a standard plaque assay on Vero cells. Representative sagittal (e) and coronal (f) brain sections illustrating the localization of HSV-1 proteins (red) on day 6 p.i. Brain sections were immunostained with a primary polyclonal rabbit anti-HSV-1/2 antibody and a secondary Alexa-594 conjugated anti-rabbit antibody, followed by staining with DAPI (blue) (scale bar = 1 mm). HSV-1 signal was localized in the ventral posterolateral nucleus (VPL) of the thalamus (white squares) and hindbrain (cerebellum, medulla, and pons). Brain regions are indicated on the representative sagittal and coronal mouse brain sections inserted in the left corners (AON.: Anterior olfactory nucleus, C.: Cerebellum, HC.: Hippocampus, HT.: Hypothalamus, IC.: Isocortex, M: Medulla, MB.: Midbrain, OB.: Olfactory bulb, P.: Pons, S: Septum, T.: Thalamus, VPN: Ventral posterior nucleus, VS.: Ventral striatum). (f) All statistical analyses were performed using Kruskal-Wallis with "Dunn's multiple comparisons test." Statistically significant results are indicated as follows: *, $P < 0.05$; **, $P < 0.01$.

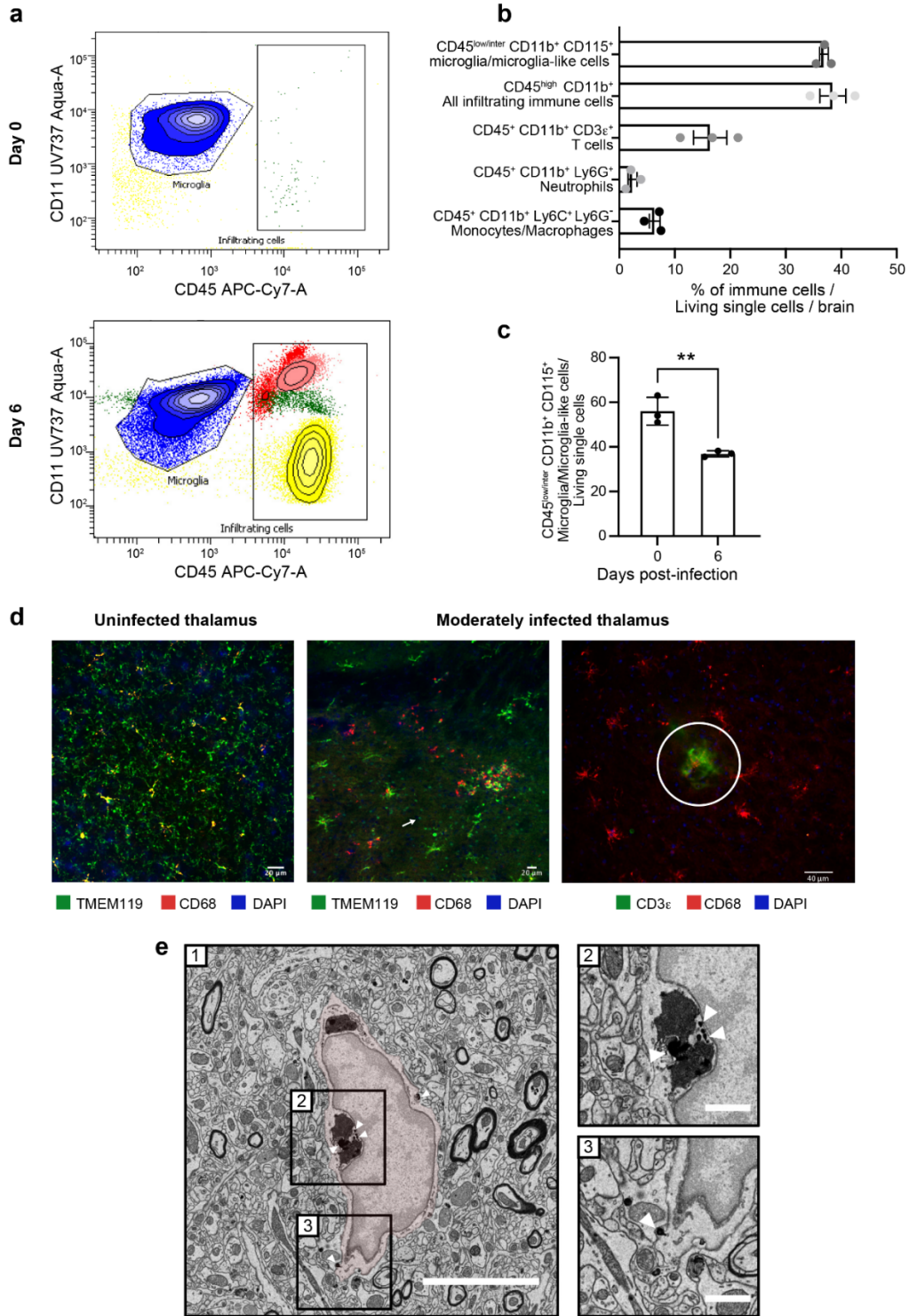


Figure 2: Reactive microglia are involved in the HSV-1⁺ cell clearance and antigen presentation in moderately-infected thalamus (a) Representative flow cytometry plots for CD45⁺CD11b⁺ gate showing infiltrating immune cell populations (T cells represented in

yellow, neutrophils in red, monocytes/macrophages in light pink) and microglia/microglial-like cell (in blue) in whole brain homogenates on day 0 (top) and day 6 p.i. (bottom). (b) Percentages of different immune cell populations, compared to all living single cells obtained from a whole-brain on day 6 p.i. (c) Mice infected with HSV-1 showed reduced percentages of CD45⁺CD11b⁺CD115⁺ microglia/microglial-like cells in the thalamus on day 6 p.i. The results represent the means \pm SEM for 3 mice per group at each time point. Statistical analyses were performed using an unpaired t-test. Statistically significant results are indicated as follows: **, P < 0.001. (d, left) Immunofluorescence image of uninfected VPL (day 0) immunostained for TMEM119⁺ (green) CD68⁺ (red) shows surveillant microglia. (d, middle) Immunofluorescence analyses of brain sections of moderately infected VPLs on day 6 p.i. show TMEM119⁺ (green) CD68⁺ (red) microglia/microglial-like cells gathering around HSV-1⁺ cells (pink). TMEM119⁺ amoeboid microglia/microglial-like cells (white arrow) are visualized. (d, right) Fluorescent microscopy image shows colocalized signals of TMEM119⁺ (red) microglia/microglial-like cells establishing a direct contact with CD3e⁺ (green) T cells (white circle). Nuclear staining was done with DAPI for both images. (e) HSV-1⁺ nanoparticles are specifically found within the endosome and at the membrane of microglia/microglial-like cells in SEM images of VPL on day 6 p.i. On the representative picture of HSV1-immunopositive microglia/microglial-like cells (e-1), the microglia/microglial-like cell are pseudocolored in red, and square boxes identify subcellular compartments. (e-2, 3). Insert at higher magnification shows nanogold particles within the (e-2) endosomes containing digested contents and (e-3) at the cellular membrane. Scale bars are equivalent to 5- μ m at low-magnification (e-1) and 1- μ m at higher-magnification (e-2, 3).

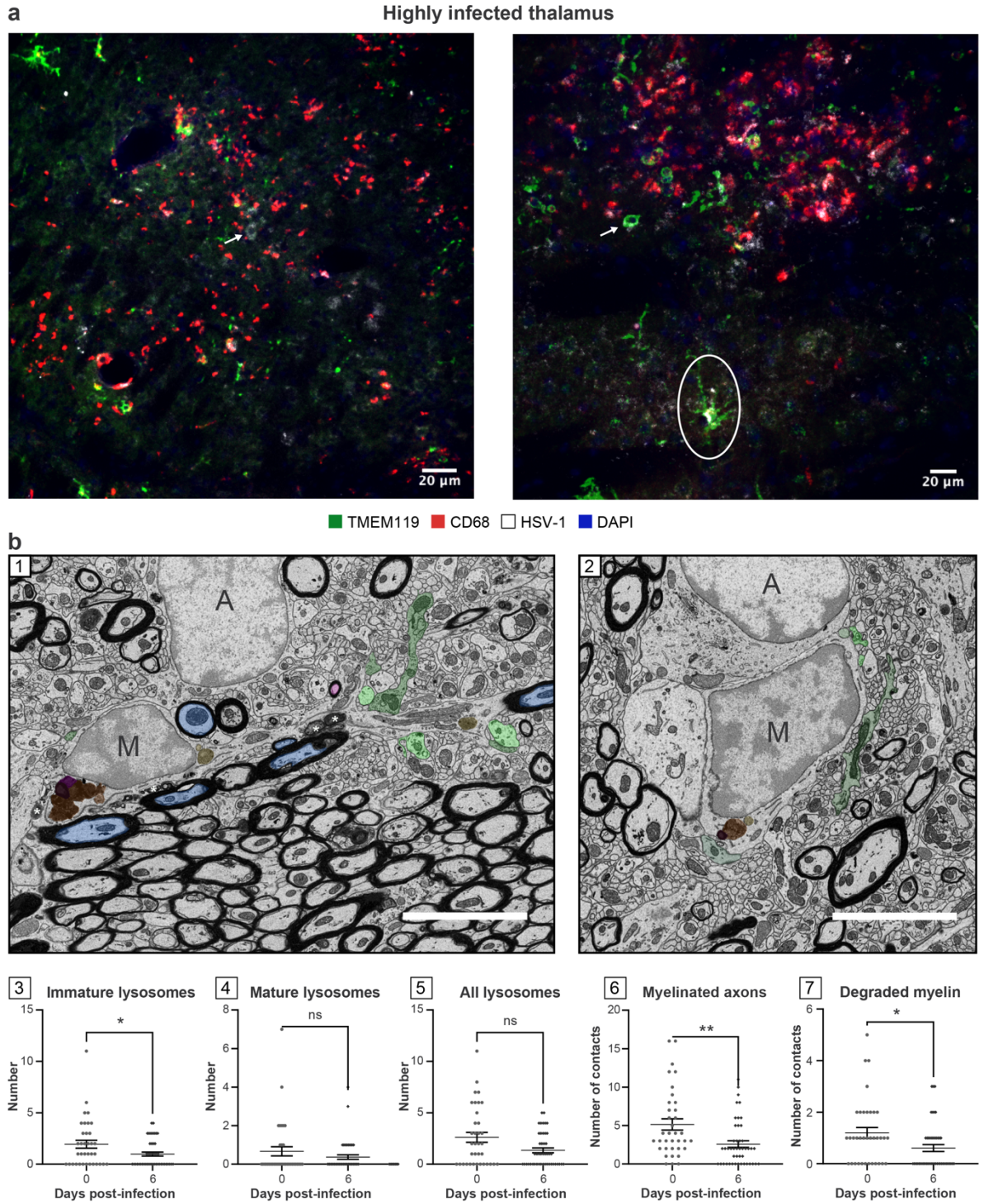


Figure 3: TMEM119⁺ microglia/microglial-like cells exhibit impaired functions, including reduced phagocytic activity in highly infected thalamus (a) HSV-1 infected thalamus was labeled with antibodies against TMEM-119 (green), CD68 (red), HSV-1 (white), and counterstained with DAPI (blue). (left) Highly-infected thalamus

immunostained with TMEM119 (green), CD68 (red), HSV-1 (white) antibodies, and counterstained with DAPI showed increased numbers of TMEM119⁺/CD68⁺ cells in close/direct contact with HSV-1⁺ CNS cells (white arrow) on day 6 p.i.. (right) Confocal microscopy image shows TMEM119⁺ ameboid microglia/microglia-like cells (white arrow) with the lack of CD68 expression. HSV-1 signal was colocalized with TMEM119⁺/CD68⁻ ramified (white circle) and ameboid microglia/microglia-like cells (white arrow), suggesting an impaired phagocytic activity following microglial infection by HSV-1 or the phagocytosis of HSV-1⁺ CNS cells. (b) (1,2) Representative pictures at day (1) 0 and (2) 6 p.i. showed that on day 6 p.i. microglia/microglial-like cells have a lower number of (3) immature lysosomes without major changes in (4) mature and (5) total lysosomes number and made fewer contacts with (6) myelinated axons and (7) degraded myelin. (1,2) Microglia/microglial-like cell organelles and elements of their microenvironment that are in contact with the cell body are pseudocolored; immature lysosomes are in yellow, mature lysosomes are in orange, lipofuscins are in pink, lipid bodies are in dark purple, myelinated axons are in blue, presynaptic axon terminals are in light green, and postsynaptic dendrites or dendritic spines are in dark green. Myelin degradation is distinguished by a white asterisk (*). Apparent cell bodies are identified by a capital letter, where "M" stands for microglia/microglial-like cell, and "A" stands for astrocytes. Scale bars are equivalent to 5 μ m. (3-7) Graphs show means (thin wide bar) \pm SEM, where individual values are represented by dark gray circles at day 0 (uninfected control) and black diamonds at day 6 p.i..

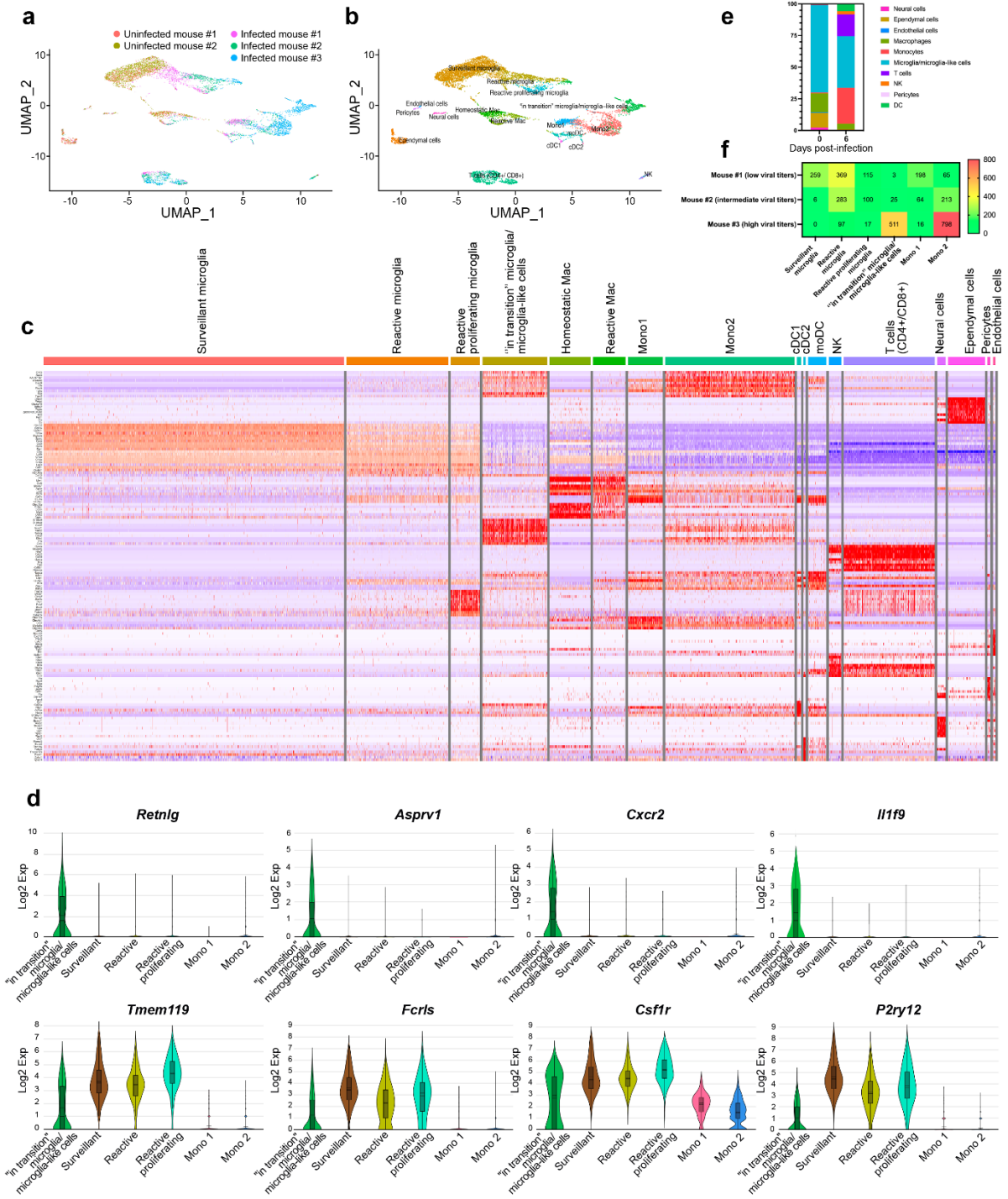


Figure 4: scRNA-seq reveals novel HSE-associated microglia/microglia-like cell transcriptome expressing neutrophil-related genes in highly infected thalamus. Chromium 10X coupled with Illumina sequencing was used to analyze the transcriptome of 2000 CD11b⁺ immune cells isolated with magnetic beads from the thalamus of the intranasally-infected mouse on day 6 p.i. (a) td-UMAP visualization of aggregated scRNA-

seq data, labeled by sample (three infected and two uninfected mice on day 6 p.i.), showing different cell clusters for each sample (b) td-UMAP visualization of all sub-clusters labeled with different colors on aggregated scRNA-seq data. (c) Heatmap showing the top 150 genes whose levels of expression are highest and most differentiating in each of the 17 cell sub-clusters, revealing similar transcriptomic signatures between “in transition” microglia/microglia-like cell and Mono2 subsets (d) Violin plots demonstrating differential expression (in log₂ fold-change) of 4 neutrophils (*Retnlg*, *Asprv1*, *Cxcr2*, *Il1f9*) and 4 microglia (*Tmem119*, *Fcrls*, *Csf1r*, *P2ry12*)-related genes in “in transition” microglia/microglia-like cells, surveillant microglia, reactive microglia, reactive proliferating microglia, Mono1, and Mono2. Statistical analyses were performed on Loupe Browser v5. Statistically, significant results are indicated as follows: **** P < 0.001. (e) Stacked bar plot showing the mean relative proportion of each cell type in the thalamus of three HSV-1 infected mice (day 6 p.i.) and two uninfected control group (day 0). (f) Heatmap showing the number of surveillant, reactive, reactive proliferating microglia, “in transition” microglia/microglia-like cells, Mono 1 and Mono2 in three infected samples with different viral titers on day 6 p.i. The minimum and the maximum number of cells (0 and 800 cells, respectively) correspond to red and green colors, respectively.

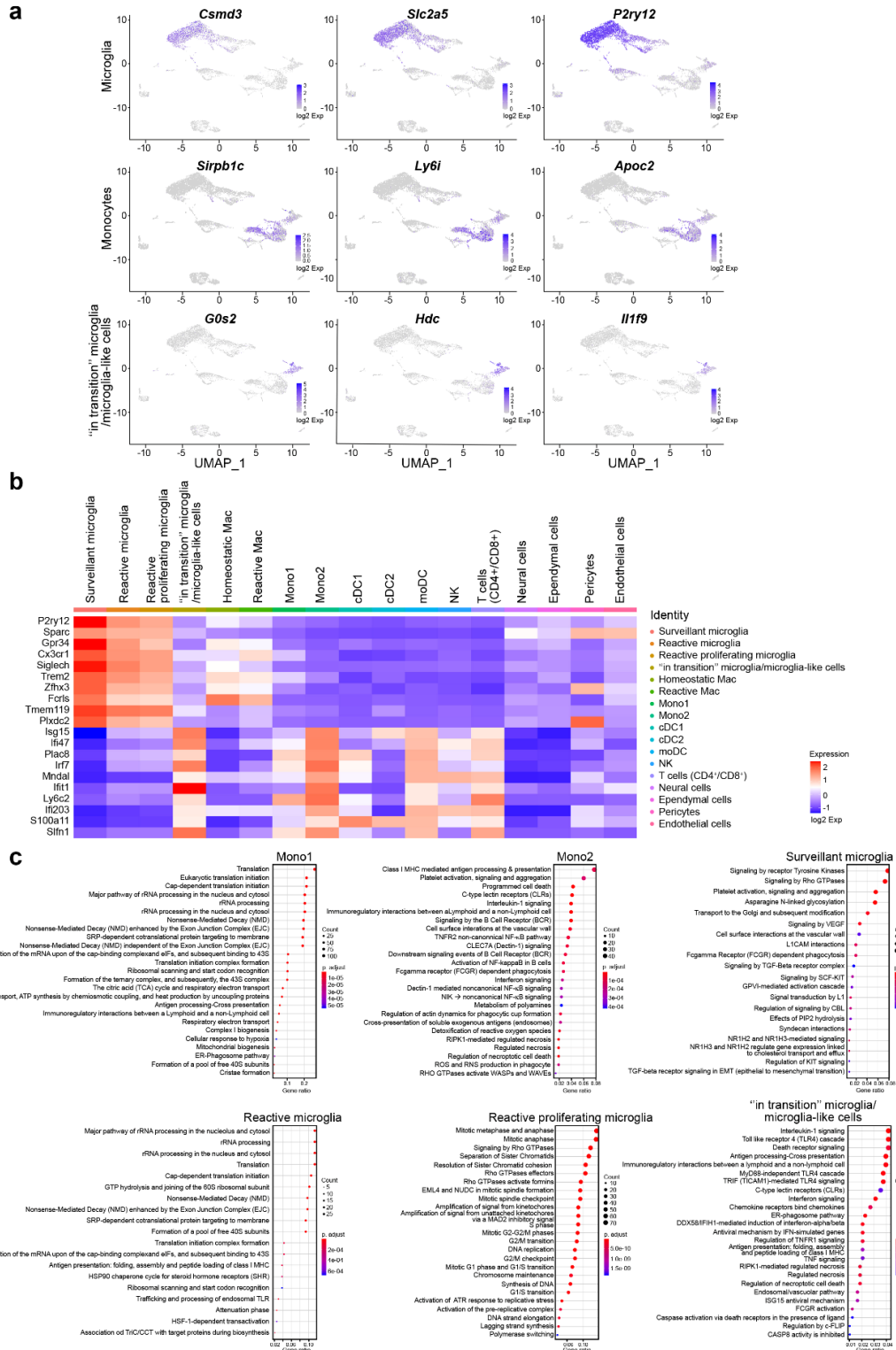


Figure 5: The analysis of up-regulated pathways uncovers HSV-1-mediated pro-inflammatory response of “in transition” microglia/microglia-like cells during HSE. (a) Feature plots show the distribution of the top three cluster-specific genes with the highest

expression levels on two-dimensional UMAP (td-UMAP) visualization of aggregated data (three infected and two uninfected mice on day 6 p.i.). *Csmd3*, *Slc2a5*, *P2ry12* for microglia, *Sirpb1c*, *Ly6i*, *Apoc2* for infiltrating monocytes, and *G0s2*, *Il1f9*, *Hdc* for “in transition” microglia/microglia-like cells. (b) Homemade heatmap shows increased levels of IFN-stimulated genes involved in antiviral response for “in transition” microglia/microglia-like cells. (c) Dot plots showing the first 25 most significantly up-regulated Reactome pathways in monocytes and microglial cell sub-clusters. The size of each dot represents the number of genes in each cell sub-cluster, and the color of each dot indicates the normalized enrichment score of each pathway (p-adjust). Pathways that were not significantly enriched (Q value \geq 0.05, Benjamini-Hochberg correction) are not displayed.

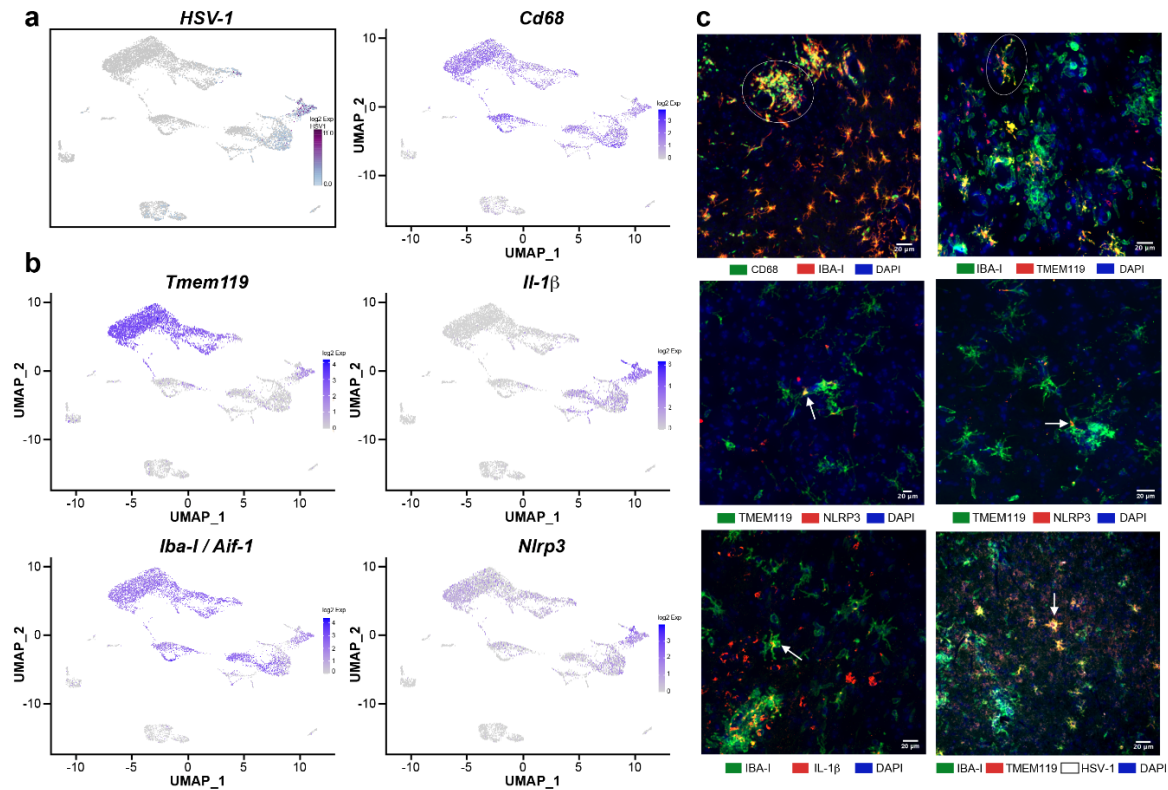
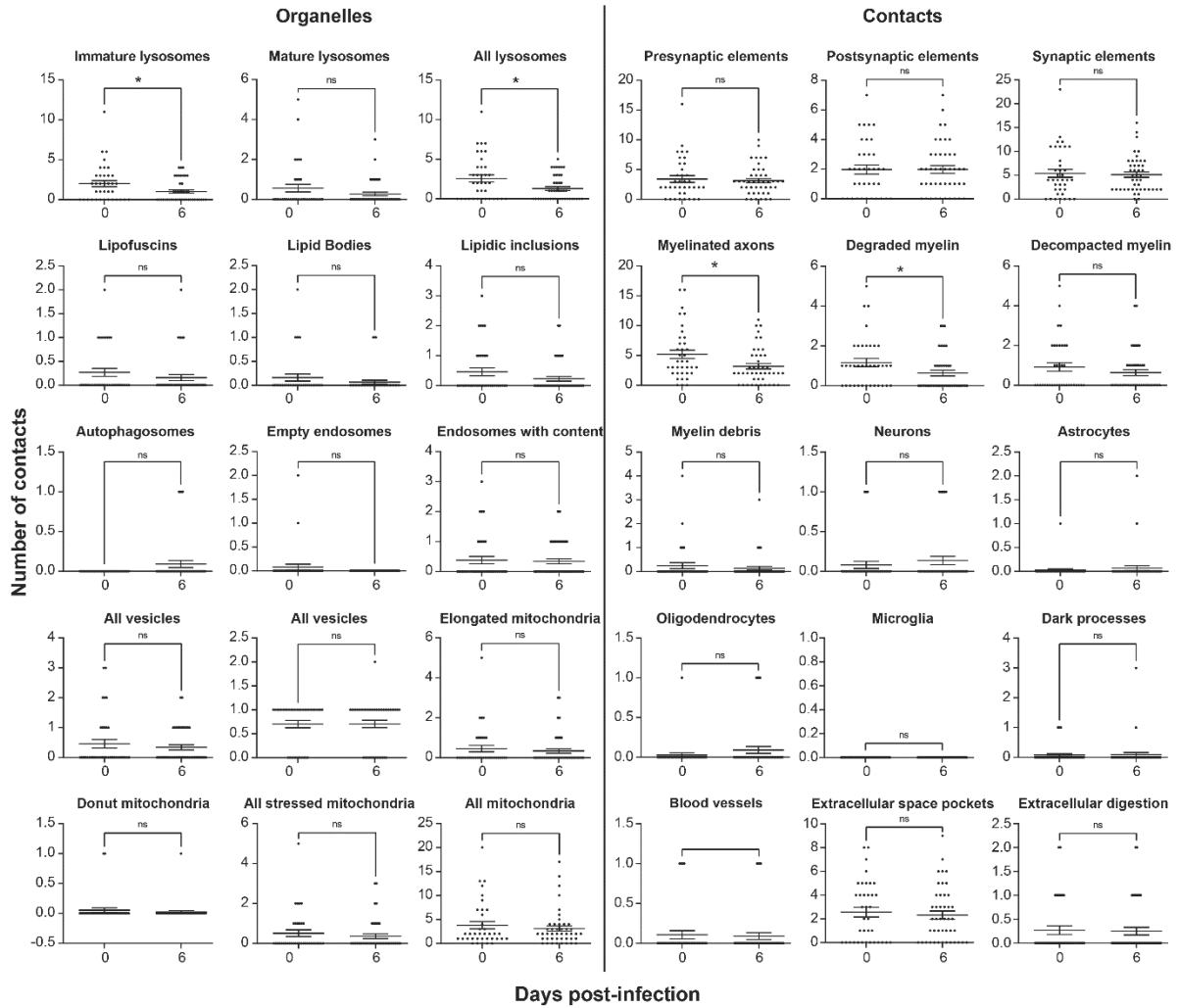
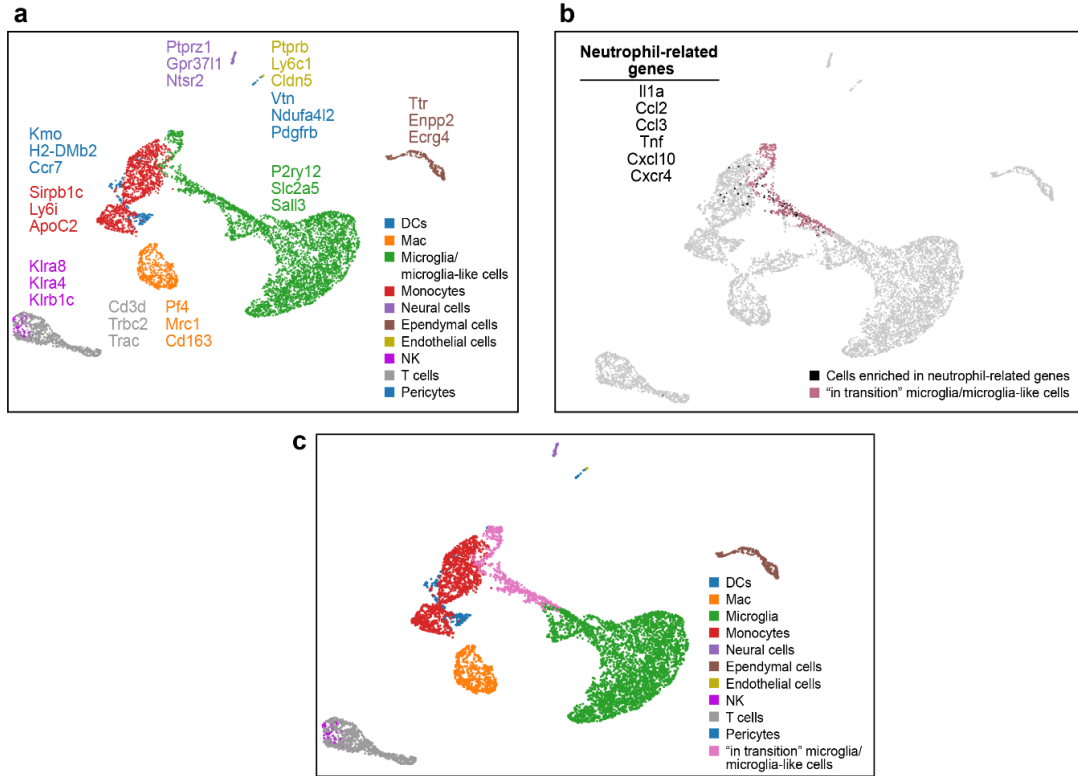


Figure 6: *In situ* characterization of “in transition” microglia/microglia-like cells in HSV-1-infected VPLs. (a) The distribution of HSV-1 transcripts was analyzed to identify infected cell sub-clusters on two-dimensional UMAP (td-UMAP) visualization of aggregated data (three infected and two uninfected mice on day 6 p.i.). “In transition” microglia/microglia-like cell sub-cluster corresponds to HSV-1 infected microglia/microglial-like cells. (b) Feature plots show the distribution of *Tmem119*, *Iba-I* (*Aif1*), *CD68*, *Nlrp3*, and *Il-1β* genes with on td-UMAP of aggregated data. Available antibodies against the proteins encoded by canonical genes were used to identify “in transition” microglia/microglia-like cells. (c) (top, left) IBA-I⁺ cells expressing high levels of CD68 clustered (white circle) in highly infected thalamus. (top, right) TMEM119 and IBA-I immunostaining revealed ramified TMEM119⁺/IBA-I⁺ cells (white circle) near clusters of TMEM119⁺/IBA-I⁺ cells in infected thalamus on day 6 p.i. Inflammasome activity in “in transition” microglia/microglia-like cells was studied using NLRP3 (middle, left, and right) and IL-1β (bottom, left) immunostaining on HSV-1⁺ VPLs. Confocal microscopy images revealed TMEM119⁺/NLRP3⁺ and IBA-I⁺/IL-1β⁺ microglia/microglia-like cell populations (white arrow) highlighting “in transition” microglia/microglia-like cells. (bottom, right)

Immunohistochemical staining for HSV-1 showed that these ramified TMEM119⁺/IBA-I⁺ cells were HSV-1⁺ (white arrow) (scale, 20 μ m).



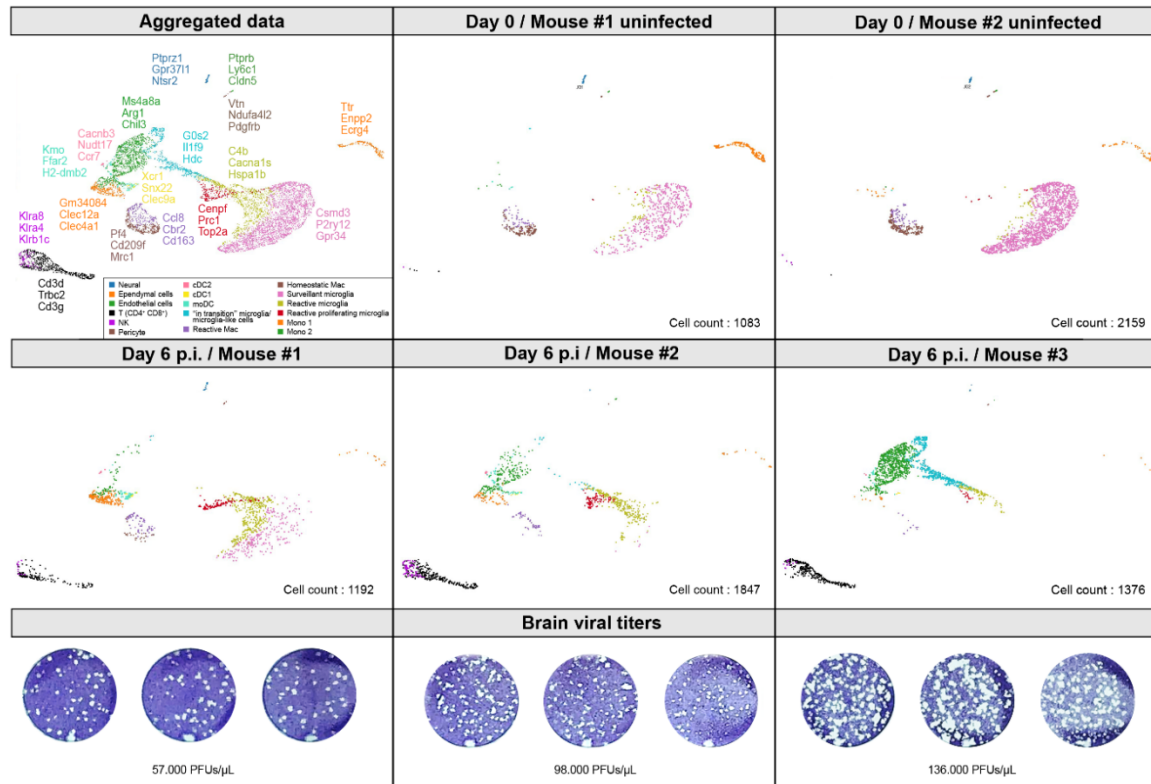
Supp. Fig. 1: Microglial and microglial-like cell organelles and elements of their microenvironment that are in contact with the cell body were analyzed on SEM images of VPL from days 0 and 6 p.i. Graphs show means (thin wide bar) \pm SEM, where individual values are represented by dark gray circles at day 0 (uninfected control) and black diamonds at day 6 p.i.



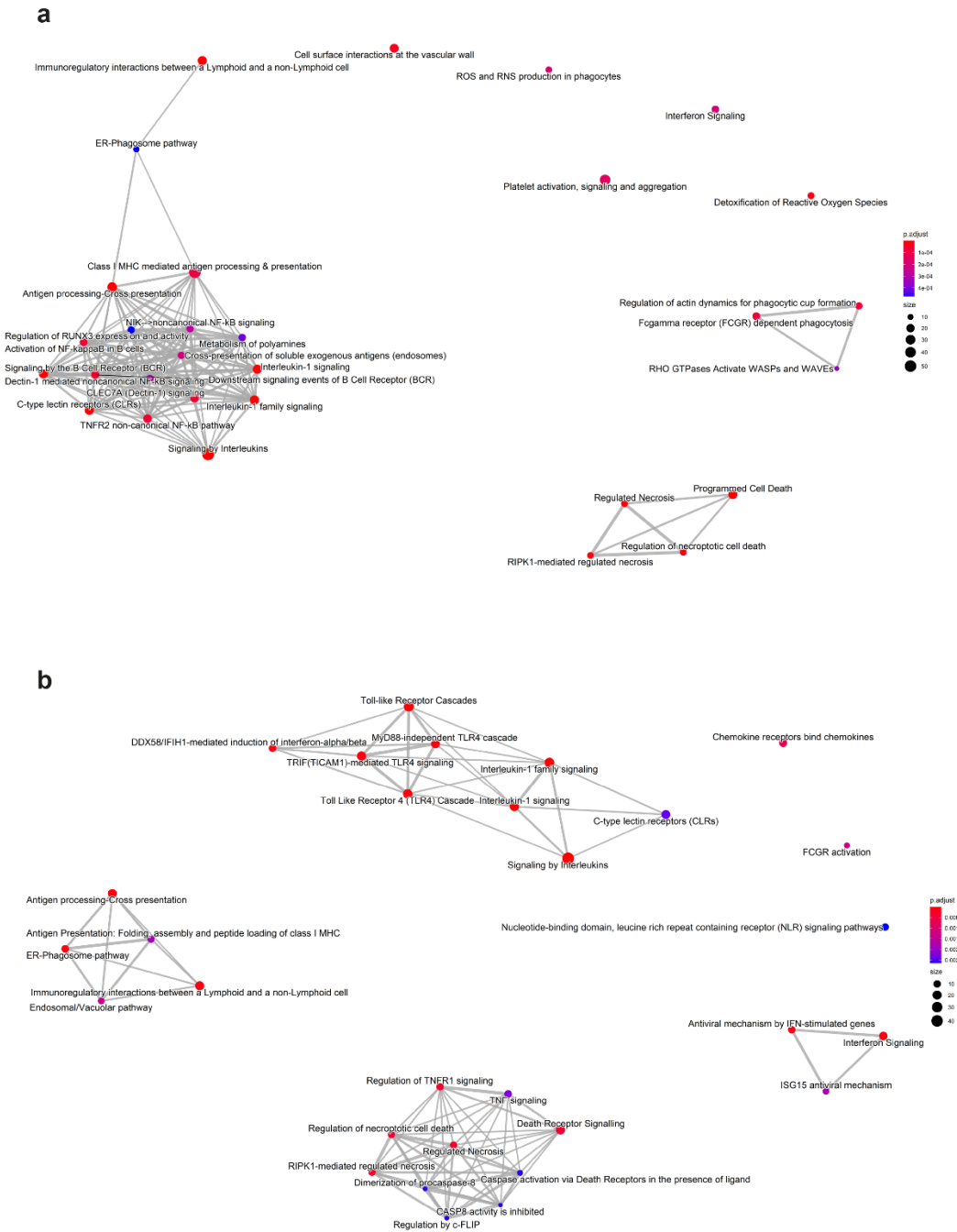
Monocytes				Microglia				"in transition" microglia/microglia-like cells			
Name	Average	Log2 Fold Change	P-Value	Name	Average	Log2 Fold Change	P-Value	Name	Average	Log2 Fold Change	P-Value
Sirpb1c	1.051444	4.48857851	1.54E-71	Csm2d3	1.183549	6.25412588	5.09E-106	G0s2	6.6460742	5.839526771	5.51E-90
Ly6i	3.423232	4.439926346	3.07E-71	P2ry12	19.02723	5.348293536	3.43E-98	Il1f9	1.4582742	5.722667225	8.95E-81
Apo2	2.226213	4.377512877	1.40E-67	Slc2a5	1.888447	5.602820885	7.70E-98	Hdc	4.4827156	5.120618988	8.95E-81
Ms4a8a	1.540931	4.306811658	1.72E-65	Gpr34	9.81375	5.108637954	9.86E-92	Cxcl2	55.854944	5.131280734	6.27E-78
Arg1	3.702303	4.551256751	5.40E-60	Eccsr	1.8351	5.106367119	1.50E-86	Ankrd33t	1.0198298	5.271376196	3.47E-76
Klra2	1.555552	4.024781699	1.11E-59	Siglech	9.544795	4.771071643	4.07E-83	Accd1	1.7014802	4.581789938	1.95E-71
Cfb	5.980008	4.014147985	1.11E-59	Col27a1	1.794018	4.808202703	8.15E-80	Cxcr2	1.435596	5.171041467	1.03E-68
Chil3	31.66029	4.156525376	2.12E-58	Plxdc2	4.833799	4.517245384	2.45E-76	Hcar2	5.6681646	4.400104723	2.03E-62
Saa3	15.31142	4.454108847	4.56E-58	Gm26802	1.057643	4.780171929	2.42E-74	S100a9	40.250291	5.296217812	4.03E-61
F10	1.245332	4.208532721	8.83E-57	Adgrg1	2.277545	4.515033224	6.37E-74	Mirt1	1.2507347	4.416681548	9.85E-60
Nox2	2.01634	4.195070145	1.78E-56	Sox4	1.71141	4.618098242	3.10E-73	Rsad2	41.393133	3.896765404	7.94E-53
Bst1	1.491983	3.906395935	1.49E-55	Nav2	1.759438	4.480565134	4.05E-72	Sic7a11	2.399074	4.115786483	2.78E-51
Tgfb1	11.68794	3.772378845	2.94E-54	Sparc	27.92195	4.251829215	5.42E-70	Lcn2	2.9557197	4.751265533	4.14E-51
Ec1	2.914674	3.970571622	8.20E-53	Tmx4	6.20739	4.141348745	2.50E-65	Clec4d	3.9714262	3.931473646	1.40E-50
Gm15056	2.484307	5.081462665	2.66E-52	Sall3	1.298225	4.215720491	4.99E-65	Il1b	16.447848	3.87680677	1.67E-48
Hp	3.050078	3.885011611	2.87E-51	Cx3cr1	38.78034	4.039599269	1.16E-64	Trem1	1.4349088	3.970176635	5.56E-48
Tamr1	1.272667	3.803398004	3.42E-51	Sall1	2.288924	4.054646978	4.79E-63	S100a8	23.142028	4.994583663	6.59E-48
Ms4a3	15.19572	3.63932785	2.31E-50	Rtn4r1	1.00666	4.130796762	1.84E-62	Ptgs2	1.784015	3.914034578	3.44E-47
C4c	2.737314	3.708155785	1.34E-49	Tmem119	10.87228	3.919938091	1.35E-61	Sifn4	12.883942	3.669655774	9.72E-46
Timp1	3.678783	4.313690225	2.76E-48	Rapgef5	1.241626	4.048118531	2.77E-61	Clec4e	4.6084762	3.537666856	6.41E-40
Vcan	1.555552	3.831783062	1.27E-46	Rasgrp3	2.180603	3.890406101	3.65E-59	Cstcd4	1.6589415	5.828546544	8.69E-40
Pirb	3.783037	3.500006204	4.89E-46	Adamt1	3.149875	3.818836143	1.10E-58	Gadd45b	6.9278331	3.516132253	3.67E-39
Gpr141	1.775504	3.549867706	5.86E-45	Goim1	4.116931	3.933383816	1.84E-58	Spp1	33.204257	3.89961789	1.86E-38
Alec1	1.893743	3.535487054	6.22E-45	Tanc2	3.06579	3.782697922	7.24E-58	Ch25h	3.8567317	3.482551481	5.13E-38
Clec4a1	1.619122	3.500412508	2.86E-44	Olfml3	10.89858	3.707380076	2.17E-56	Il1b1	3.124775	3.335331241	5.99E-37
Clec12a	1.737998	3.490822101	5.82E-44	Nusk1	1.012719	3.853698285	2.53E-56	Cd44a	1.717897	3.825511328	7.10E-37
AA467197	17.72516	3.510987904	9.07E-44	Lrrc3	1.000896	3.840521978	2.87E-56	Retnlg	4.9479614	5.670786428	7.10E-37
Ly2	70.63682	3.405695181	3.16E-43	Tgfb1	5.822134	3.663166274	3.59E-55	Ccl4	81.507355	3.257014336	8.66E-36
Gm21188	1.022838	3.370198147	4.94E-40	Zfh3	6.616881	3.633660078	1.49E-54	Cd274	5.6324294	3.25325225	1.44E-35
Gda	2.437265	3.356145374	1.13E-39	Nav3	2.098144	3.659709261	2.26E-54	Ifit1	21.544936	3.213290872	2.24E-35
Plazg7	3.010664	3.288510666	4.59E-39	Serpine2	2.407294	3.65291887	2.46E-54	Ifit2	1.5867837	3.35023711	2.42E-35
Ifi44	1.933157	3.330439954	8.13E-39	Fosb	17.10405	3.605290997	1.30E-53	Ifitn	16.575671	3.190045768	3.87E-34
Fn1	2.702351	3.39782066	7.15E-37	Tmem100	0.374025	3.968568977	5.57E-53	Cmpk2	3.888273	3.165219297	1.34E-32
Calhm6	2.741764	3.165459028	5.52E-36	Trem2	13.81202	3.555239349	7.94E-53	Tnfaip2	2.509716	3.14549719	5.32E-32
Cd38	1.332422	3.155613503	1.57E-34	Hexb	49.19229	3.531054017	2.43E-52	Plaur	1.8197502	3.127394808	7.41E-32
Ifi205	4.641865	3.083527234	9.44E-34	Arhgap5	5.300628	3.521498744	1.07E-51	Mxd1	9.8952355	3.010241323	1.06E-30
Fgr	1.144892	3.094322632	1.86E-33	Ttc28	1.244877	3.607108243	1.59E-51	Ets2	2.3660876	3.033411304	2.59E-30
Ccr2	5.223528	2.997100912	2.12E-32	Gal3st4	1.053505	3.616033401	2.11E-51	Trim30b	1.9386388	3.026581781	4.76E-30
Ifitm2	10.06119	2.976805759	2.90E-32	Sico2b1	3.993093	3.495192724	3.82E-51	Ccr1	7.8060963	3.020798588	1.03E-29
Egr1	1.601323	3.044147024	2.32E-31	Egr1	23.85452	3.419932569	1.99E-49	Lilr4b	3.7906882	2.963163384	1.03E-29
Sell	2.437901	3.000022756	2.37E-31	Trim47	1.16286	3.411666017	5.58E-47	Trim30c	1.6493205	2.908695434	7.15E-27
Cxcl9	11.11962	3.143065717	2.88E-31	Cxcs5	1.31847	3.368032302	2.57E-46	Ifit3	11.05457	2.797802076	3.18E-26
Ly6c2	23.96199	2.94428555	3.69E-31	Ivns1abp	4.175746	3.280178205	3.85E-46	Ddx60	2.601803	2.797718924	1.10E-25
Plnc8	32.73357	2.930469897	3.93E-31	Cst3	285.0089	3.261847348	5.58E-46	Cxcl10	44.780425	2.788480643	1.98E-25
Ifitm6	2.305876	3.005034675	4.06E-30	Pst1	4.927342	3.262150644	9.51E-46	Oasl1	6.4144821	2.754482314	5.30E-25
Ifit1b1	2.413744	2.98654748	8.96E-30	Fcst1	1.534964	3.37322467	1.49E-45	Adam8	1.2101889	2.832167374	6.32E-25
AB124611	2.415016	2.873401376	1.21E-29	Tmem102b	2.491084	3.253260279	3.31E-45	Csf1	2.4231266	2.746024733	6.80E-24
Xdh	1.802839	2.913354918	2.52E-29	Ctcf	1.177195	3.318129247	3.47E-45	Lilr4a	5.5327829	2.85852006	1.21E-23
Metrnl	1.429048	2.872368115	6.38E-29	Gm34455	2.546944	3.269221785	4.65E-45	Csrnp1	2.7014495	2.675862041	1.77E-23
Lgals3	13.22506	2.826126650	2.20E-28	Crybb1	2.924663	3.253456065	5.65E-45	Cd300f	3.5659683	2.67567851	2.02E-23

Supp. Fig. 2: UMAP visualization (a) of aggregated and individual scRNA-seq data of two uninfected and three infected mice on day 6 p.i., showing different major cell clusters for

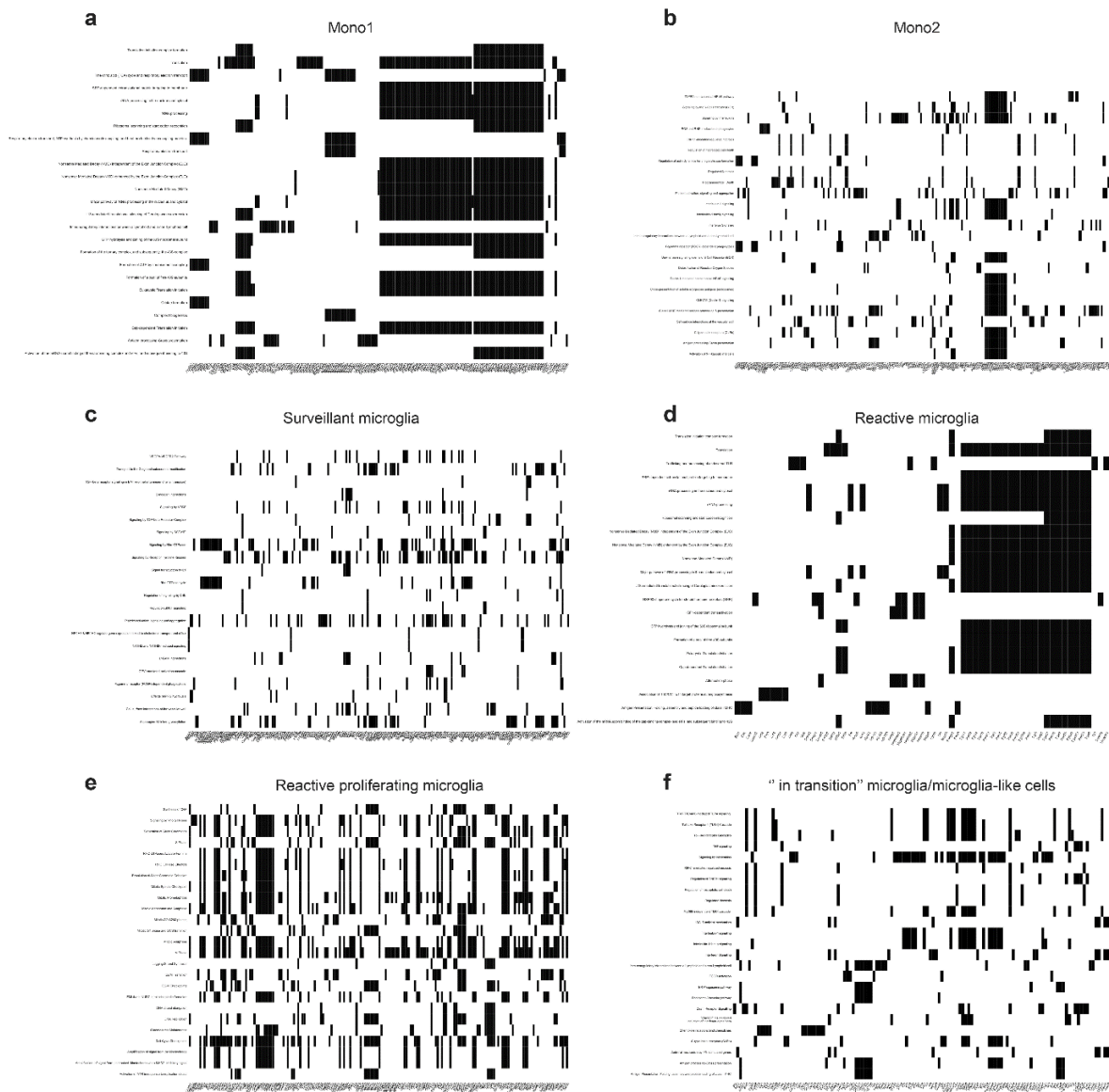
each sample. (b) UMAP visualization of cells enriched in neutrophil-related genes on Loupe Browser (\log_2 fold-change >8 for *Il1a*, *Ccl2*, *Ccl3*, *Tnf*, *Cxcl10*, *Cxcr4* together). (c) The analysis of upregulated cluster-specific genes (\log_2 fold-change >4 ; $P<0.05$) for infiltrating monocytes, total microglia (surveillant, reactive and reactive proliferating), and “in transition” microglia/microglia-like cells. “In transition” microglia/microglia-like cells were considered a major cell cluster. Major clusters were analyzed for locally distinguishing genes on Loupe Browser.



Supp. Fig. 3: UMAP visualization of aggregated and individual scRNA-seq data of two uninfected and three infected mice on day 6 p.i., showing different cell sub-clusters for each individual sample. Representative plaque assay wells used to determine the viral titers are provided below UMAP.



Supp. Fig. 4: Enrichment maps of Reactome pathways for Mono2 (a) and “in transition” microglia/microglia-like cells (b). The size of each dot represents the number of genes in each cell sub-cluster, and the color of each dot indicates the normalized enrichment score of each pathway (p-adjust). Pathways that were not significantly enriched (Q value \geq 0.05, Benjamini-Hochberg correction) are not displayed.



Supp. Fig. 5: Heatplots for monocytes and microglial cell sub-clusters. Heatmap-like functional classification of different genes into Reactome pathways were performed for (a) Mono1, (b) Mono2, (c) surveillant, (d) reactive, (e) reactive proliferating, and (f) “in transition” microglia/microglia-like cells.

Table 1 Antibodies used for flow cytometry and immunofluorescence analyses

	Target	Host	Clone	Fluorochrome	Manufacturer
Flow cytometry	CD45	Rat	30-F11	APC-Cy7	BD Biosciences
	CD11b	Rat	M1/70	BUV737	BD Biosciences
	CD3 ϵ	Hamster	145-2C11	PE-CF594	BD Biosciences
	B220	Rat	RA3-6B2	PerCP-Cy5.5	BD Biosciences
	Ly6C	Rat	AL-21	BV605	BD Biosciences
	Ly6G	Rat	1A8	FITC	BD Biosciences
	CD115 (Csfr1)	Rat	AFS98	APC	eBioscience
	Viability Stain 510	No	No	BV510	BD Biosciences
	CD16/CD32	Mouse	93	Unconjugated	BD Biosciences
Immunofluorescence	TMEM-119	Rabbit	28-03	Unconjugated	Abcam
	HSV-1/-2	Goat	Polyclonal	No	Bio-Rad

HSV-1/-2	Mouse	Polyclonal	No	Bio-Rad
CD68	Rat	FA-11	No	Bio-Rad
CD3ε	Hamster	145-2C11	No	Invitrogen
IBA-I (Aif1)	Mouse	20A12.1	No	Sigma-aldrich
NLRP3	Rat	768319	No	Invitrogen
IL-1β	Rabbit	Polyclonal	No	Novus Biologicals
Goat IgG	Donkey	Polyclonal	Alexa647	JacksonImmunoResearch
Goat IgG	Donkey	Polyclonal	Alexa546	Invitrogen
Rat IgG	Goat	Polyclonal	Alexa546	Invitrogen
Rat IgG	Goat	Polyclonal	Alexa488	Invitrogen
Mouse IgG	Goat	Polyclonal	Alexa488	Invitrogen
Mouse IgG	Donkey	Polyclonal	Alexa546	Invitrogen
Rabbit IgG	Goat	Polyclonal	Alexa488	Invitrogen

	Rabbit IgG	Goat	Polyclonal	Alexa546	Invitrogen
	Hamster IgG	Goat	Polyclonal	FITC	JacksonImmunoResearch

CHAPITRE-V : Discussion

Le VHS-1 infectant près de 60% de la population mondiale donne souvent des infections asymptomatiques. Cependant, ce virus neurotrope peut aussi donner des infections graves, telles que la kératite et l'encéphalite, qui est l'encéphalite sporadique virale la plus mortelle dans les pays industrialisés (88). Le VHS-1, souvent en latence dans les neurones sensoriels des nerfs trijumeaux, s'active en raison de multiples facteurs incluant la déficience immunitaire, et infecte rarement le SNC. Les immunosupprimés, une population en croissance en raison de leur espérance de vie qui augmente grâce à l'amélioration de la prise en charge médicale et des nouvelles indications des traitements immunosuppresseurs, représentent la population la plus touchée par l'EH. Les traitements antiviraux disponibles, comme l'ACV, diminuent le taux de mortalité de 70% à 20%. Cependant, plusieurs patients souffrent toujours des séquelles neurologiques post-EH, malgré les antiviraux (541). À l'heure actuelle, on sait que le VHS-1 induit la mort des cellules du SNC et provoque une inflammation persistante même après la clairance virale. L'inflammation, considérée bénéfique dans la phase précoce de la maladie, est de plus en plus acceptée comme responsable du mauvais pronostic de l'EH (542). Au cœur de cette réponse immunitaire, on trouve les seules cellules résidentes du SNC, que sont les microglies. Ces dernières années, les microglies, négligées depuis longtemps, sont devenues le centre d'attention dans les maladies du SNC dont l'EH. Durant mes travaux de thèse, nous nous sommes intéressés au rôle des microglies dans notre modèle de souris atteintes d'EH.

Au sein de notre laboratoire, nous utilisons des modèles murins infectés par la voie intranasale afin d'étudier l'EH. Pour que le VHS-1 puisse infecter le SNC, il faut qu'il soit neurovirulent. Dans nos études, une souche clinique neurovirulente du VHS-1, appelé H25, est utilisée. Les cerveaux de ces souris infectées sont prélevés à différents temps de l'infection. Ensuite, nous utilisons différentes techniques conventionnelles de la virologie et de l'immunologie, afin d'étudier différents aspects de cette maladie. Cette approche classique nécessite de faire des moyennes à partir de données obtenues de plusieurs souris sacrifiées au même moment, et ne permet pas d'effectuer un suivi longitudinal d'une même souris atteinte d'EH. Certaines des techniques conventionnelles utilisées dans les études d'EH sont fastidieuses et coûteuses. Par exemple, la quantification virale par plaque, qui représente la

technique de base, nécessite le prélèvement du cerveau, son homogénéisation et l'infection des cultures cellulaires de type Vero par ces homogénats du cerveau. Un autre exemple est l'immunomarquage sur les coupes du cerveau. Cette dernière requiert le prélèvement du cerveau à la suite d'une perfusion intracardiaque à la paraformaldéhyde (PFA), des coupes au microtome, le traitement de ces coupes par des anticorps et enfin l'imagerie en microscopie. En plus du temps consacré et du coût élevé, un nombre important d'animaux est sacrifié pour réaliser ces études d'EH.

En première partie de mes travaux de doctorat, nous avons conçu un nouveau VHS-1 recombinant, appelé le rVHS-1, afin de surmonter une grande partie des problèmes rencontrés lors des études *in vivo* d'EH, tel qu'énuméré ci-haut (543). Nous avons décidé de créer un outil, rVHS-1, adapté au IVIS et à la microscopie fluorescente biphotonique. Ceci nous permettra d'effectuer des études de l'évolution temporelle *in vivo* de l'EH. À cette fin, deux gènes rapporteurs codant pour la Gluc bioluminescente et la tdTomato fluorescente, ont été insérés dans le génome du H25.

Une des importantes décisions à prendre durant cette étude était la méthode à adopter pour la génération du virus recombinant. Plusieurs VHS-1 recombinants ont été générés dans le passé à l'aide des différentes techniques comme l'insertion d'un BAC. L'utilisation de ces souches BAC-VHS-1 du laboratoire représentait la première option de génération. Cependant, différentes pressions de sélection soumises à ces souches BAC durant les étapes de génération chez les bactéries et les cellules mammifères favorisent l'acquisition des mutations provoquant des changements phénotypiques indésirables. Ces derniers, y compris une altération de la croissance virale et une atténuation de la neurovirulence, déjà rapportée pour ces VHS-1 recombinants générés à partir de ces souches de laboratoire, a fait que nous avons reconsidéré le choix du modèle (544). En 2002, Luker *et al.* ont réussi à créer un VHS-1 recombinant adapté au système d'imagerie à bioluminescence en modifiant le génome de KOS, une souche de laboratoire du VHS-1 qui a déjà été clonée dans un BAC. Cependant l'absence du signal bioluminescent dans le cerveau a démontré que ce virus n'était pas neurovirulent (545). Une autre étude a également rapporté la perte de neurovirulence chez les virions générés à partir d'un BAC-KOS pour lequel la séquence BAC a été insérée dans la région intergénique UL37-UL38 (544). Une autre alternative pour favoriser la génération

des VHS-1 recombinants neurovirulents est d'utiliser une souche neurovirulente de base. Cependant, la difficulté de l'insertion de BAC dans une nouvelle souche a orienté notre choix de méthode vers le système CRISPR-Cas9. De plus, la possibilité de la mise en place d'une plateforme de l'édition génique du VHS-1 permettant non seulement de générer rapidement notre virus recombinant, mais aussi d'apporter les modifications nécessaires dans le génome du VHS-1 a rendu l'utilisation de CRISPR/Cas9 encore plus attirante. Nous avons estimé que cette nouvelle approche adaptée au VHS faciliterait la caractérisation des mutations cliniques observées chez les patients atteints d'EH.

Une fois que les gènes à insérer et la méthode d'édition ont été choisis, nous nous sommes focalisés sur le choix de la région de l'ADN viral à modifier. Ce dernier reste crucial pour éviter d'altérer le phénotype viral. Les régions intergéniques, telles qu'UL3-UL4, UL37-UL38, UL55-UL56, etc., ont été testées dans le but de ne pas perturber l'expression des gènes codants (546-548). À l'heure actuelle, on sait que même les régions intergéniques, précédemment considérées non-codantes, codent potentiellement pour les miARNs impliqués dans la pathogenèse du VHS-1. De plus, ces régions non-codantes peuvent correspondre aux séquences polyA d'un autre gène voisin (547, 549, 550). Malgré l'expression d'un ARN non-codant par la région intergénique d'UL26-UL27, Russell *et al.* a démontré que les modifications dans cette région n'affectaient pas la neurovirulence (551, 552). En se basant sur cette dernière étude, nous avons choisi la même région pour insérer les gènes rapporteurs. Pour ce faire, trois sgARNs ont été désignés en fonction de la séquence d'UL26-UL27 de la souche H25 et ensuite testés pour trouver celui avec la meilleure efficacité d'induction de la cassure double brin. La séquence -GGAATCGGCACTGACCAAGGGGG- (gRNA-2) avec la fréquence d'indel la plus élevée de 27 %, a été choisie pour générer le rVHS-1. En accord avec notre choix de sgARN, une autre étude a rapporté que l'utilisation d'un sgARN désigné pour la même séquence chez la souche KOS du VHS-1 a mené au clivage complet *in vitro* des amplicons PCR provenant de la région UL26-UL27 de cette souche. La même étude a ainsi suggéré la diminution de la réplique *in vitro* du VHS-1 suite au clivage de la région intergénique UL26-UL27 non-codante (194). Au contraire, l'insertion des gènes rapporteurs dans cette région n'a pas affecté la cinétique réplique *in vitro* de notre rVHS-1. Il ne faut pas oublier qu'une cassure de doubles brins d'ADN réparée à l'aide de NHEJ peut induire des indels dans les séquences

en amont et/ou en aval du point d'insertion, ce qui changerait le phénotype du virus. La réparation par la recombinaison homologue permet plutôt d'insérer les gènes rapporteurs entourés des bras d'homologie flanquants et évite l'apparition des mutations aléatoires, ce qui expliquerait la capacité répliquative *in vitro* inchangée de notre rVHS-1. Ces observations suggèrent que les séquences en amont et/ou en aval du point d'insertion dans la région intergénique UL26-UL27 non-codante auraient des fonctions impliquées dans la réplication virale *in vitro*.

Tel que mentionné précédemment, la manipulation *in vitro* du génome du VHS-1 peut causer la perte de neurovirulence. Contrairement à ce qui était attendu, notre rVHS-1 a montré une neurovirulence plus importante que celle du VHS-1 H25. L'étude de la cinétique répliquative *in vivo* du VHS-1 a révélé que les titres viraux dans le cerveau des souris infectées par le rVHS-1 étaient 2,7 fois plus élevés que ceux des souris infectées par la souche sauvage H25 au J6 p.i. Cependant, les taux de mortalité chez la souris BALB/c infectées par le rVHS-1 ou par le VHS-1 H25 étaient similaires. En accord avec notre observation, une étude de l'encéphalite au réovirus chez la souris C57BL/6J a également suggéré que la gravité de la maladie n'était pas corrélée aux charges virales cérébrales, ni à celles des organes périphériques (553). L'ensemble de ces résultats tout d'abord confirme que notre stratégie d'édition génique n'affectait pas la neurovirulence. De plus, les titres viraux élevés ne semblaient pas être un indicateur de faible pronostic dans notre modèle d'EH chez les BALB/c infectée par la voie intranasale. Enfin, la mortalité similaire chez les souris avec des titres viraux cérébraux différents souligne que la réponse immunitaire pourrait avoir un impact plus important que celle des titres viraux dans l'évolution de la maladie.

Les virus à ADN sont considérés génétiquement stables. Cependant, le nombre élevé de passages du VHS-1 et l'activité « *off-target* » de Cas9 peuvent augmenter le risque d'apparition de mutations. Nous avons suggéré que les mutations apparues durant le processus de génération du rVHS-1 pourraient être responsables du changement de la capacité répliquative *in vivo* du rVHS-1. Pour cela, nous avons séquencé le génome entier des deux souches de VHS-1. L'analyse des séquences nous a également permis de valider que l'insert était dans la bonne localisation. La comparaison des contigs assemblés de novo des deux souches a révélé 12 polymorphismes nucléotidiques simples (SNPs pour « *Single-*

nucleotide polymorphism ») dont cinq mutations silencieuses et trois non-silencieuses dans des régions codantes dans le génome du rVHS-1. 4 des 12 SNPs étaient des mutations sur des petits contigs qui ne pouvaient être alignés à aucun des gènes. Cela signifie que ces contigs correspondraient aux régions intégéniques. Les trois mutations non-silencieuses se situent dans UL29 (Val361Ile), UL38 (Leu156Val) et UL41 (Thr461Ile), qui codent respectivement pour ICP8, VP19C et vhs. Tout d'abord, nous avons pensé que ces mutations étaient issues de l'activité hors cibles « *off-target* » de Cas9. Les résultats de l'analyse bioinformatique sur CHOPCHOP, permettant d'identifier le risque d'avoir des « *off-target* », n'a montré aucune région possiblement ciblée par ces trois sgARNs, dans le génome du VHS-1 souche 17 étroitement apparente à H25. Une autre analyse *in silico* plus approfondie en recherchant les séquences d'homologie entre les sgARN et les gènes codants de H25 a confirmé qu'aucune modification hors cible n'était possible. L'absence des indels sur les gènes codants du VHS-1 a été rapportée par une étude utilisant le système CRISPR/Cas9 ciblant UL8 et UL29 afin d'inhiber la réplication *in vivo* du VHS-1. Cette étude a suggéré que la brève période d'expression de trois jours de CRISPR/Cas9, pourrait minimiser le risque des « *off-target* » (193). En sachant que l'apparition des variants reste toujours possible pendant les cycles de purifications par plaque, nous avons émis l'hypothèse que ces mutations sont apparues au cours de l'isolement du rVHS-1 incluant plusieurs étapes de passages. En accord avec ce dernier point, la neurovirulence accrue a été déjà rapportée pour les VHS-1 obtenus après plusieurs passages *in vitro*. Cependant, aucune analyse n'avait été effectuée pour identifier les altérations génétiques (554). Bien que les mutations observées chez le rVHS-1 n'ont jamais été documentées, d'autres mutations sur ces trois gènes impliqués dans la réplication virale et l'échappement immunitaire ont été déjà rapportés (555-557). Une étude de la cinétique *in vivo* comparant différents mutants avec une ou plusieurs de ces trois mutations identifiées sur le rVHS-1, permettrait de choisir quel gène est intéressant à investiguer pour la suite.

Notre approche d'édition génique basée sur le CRISPR/Cas9 n'a pas une grande efficacité, donc ne permet pas de transformer tous les VHS-1 H25 en un nouveau rVHS-1. Pour cela, une étape de sélection positive est nécessaire afin d'isoler le virus recombinant à partir d'une population virale mixte contenant d'autres variants et les virus sauvages. L'insertion d'un gène rapporteur est une des stratégies les plus fréquemment utilisées. Dans

le cas où la présence d'un gène étranger n'est pas désirée, le système Cre/Lox peut être combiné à l'approche CRISPR/Cas9. Une séquence contenant la mutation désirée pourrait être insérée en même temps qu'un gène rapporteur entouré par des sites *lox*. À la suite de l'isolement du virus recombinant à l'aide de ce gène rapporteur, un cycle d'infection avec le nouveau virus recombinant des cellules exprimant la recombinase Cre permettrait d'exciser ce gène rapporteur. Une étape supplémentaire de sélection négative aiderait à isoler le nouveau recombinant ayant la mutation désirée (548). Dans notre étude, nous avons inséré le gène *tdTomato* codant la protéine fluorescente rouge dans le génome du H25, pour purifier les plages de lyse causées par le nouveau virus fluorescent sous le microscope à fluorescence. Malgré le gène rapporteur, l'isolement du rVHS-1 a nécessité cinq cycles de purification par plaque, ce qui montre la faible efficacité de notre approche. Il serait intéressant de tester différents paramètres, tels que des différentes MOI (pour « *Multiplicity of infection* »), méthodes de transfection, lignées cellulaires à transfecter/infecter, tailles et/ou les séquences de bras d'homologies, inhibiteurs de NHEJ, etc. afin d'augmenter l'efficacité de cette approche (552, 558).

Les voies d'infiltration du VHS-1 restent à confirmer, bien que plusieurs études aient rapporté les nerfs trijumeaux et olfactifs, comme les voies majoritaires d'entrée de ce virus dans le cerveau (559). En plus de faciliter sa purification, la propriété fluorescence du rVHS-1 a servi à l'étude de distribution virale dans le cerveau, ce qui aurait été impossible sans l'immunomarquage. Nos résultats ont révélé que le signal tdTomato était majoritairement retrouvé au niveau du tractus optique, des bulbes olfactifs, de la strie terminale et du noyau paraventriculaire des souris BALB/c infectées par la voie intranasale au J6 p.i. Le cortex frontal n'était pas affecté, contrairement à ce qu'on peut observer chez l'Homme (560). Par la suite, les résultats obtenus de l'imagerie intravitale par bioluminescence ont également confirmé l'infection de ces régions. Nos résultats, encore une fois, ont suggéré que la voie olfactive et les circuits visuels représentent des voies possibles exploitées par le rVHS-1 pour se propager jusqu'au thalamus et l'hypothalamus, chez la souris BALB/c.

Les virus recombinants exprimant des gènes rapporteurs, comme l'influenza H5N1, le VIH et le PRV, ont été utilisés pour étudier divers aspects de la pathogenèse de ces infections à l'aide de la microscopie bi-photonique (561-563). Nous pensons qu'il serait

intéressant d'exploiter la propriété de fluorescence du rVHS-1 pour mener des études similaires d'imagerie intravitale. L'infection des souris $Ccr2^{GFP/+}$ et $Cx3cr1^{GFP/+}$ au rVHS-1 permettrait de visualiser l'interaction des microglies et des monocytes infiltrants en vert, avec les cellules infectées du SNC en rouge tdTomato. La méthode d'imagerie bi-photonique *in vivo* permet de visualiser seulement les zones superficielles (<500 μm) en raison de la diffusion et de l'excitation de fluorescence hors du plan (564). L'absence de VHS-1 dans le cortex des souris, qui est la seule région facilement accessible via la mise en place d'une fenêtre dans le crâne, complique la faisabilité de ces études. D'après plusieurs études, l'inoculation du VHS-1 au niveau des yeux ou des lèvres favorise l'infection du cortex (560). Selon ce dernier, il serait alors nécessaire de tester différentes voies d'infection pour faire ces études d'imagerie intravitale avant de procéder à l'imagerie *in vivo* par la microscopie bi-photonique.

L'ensemble des technologies de modifications génomiques et les protéines rapporteurs comme la Gluc a permis aux chercheurs de générer des pathogènes recombinants traçables à l'aide des techniques d'imagerie, comme IVIS. Afin de développer un outil similaire de virologie capable d'induire l'EH, nous avons inséré le gène du *Gaussi Luciferase* dans le génome de la souche clinique neurovirulente H25 du VHS-1. L'imagerie sur les souris BALB/c infectées au rVHS-1 a d'abord permis de visualiser les régions infectées du cerveau. L'identification exacte de ces régions était compliquée en raison du signal du Gluc secrété, qui circule librement dans le milieu extracellulaire. Cependant, nous avons constaté une forte corrélation entre les titres viraux dans le cerveau et la radiance ($\text{p/s/cm}^2/\text{sr}$) obtenus à la suite de l'injection intraveineuse du coelenterazine chez la souris BALB/c infectée au rVHS-1. En accord avec nos résultats, une forte corrélation entre l'ampleur de la bioluminescence en RLU (pour « *Relative Light Unit* ») et les titres viraux a été rapportée pour la souche KOS recombinante (KOS/Dlux/oriL) non-neurovirulente (545). Une autre étude a également pu évaluer l'impact des traitements d'anticorps monoclonaux sur la réplication d'un virus de la grippe A exprimant Gluc grâce à la corrélation entre les RLU et les titres viraux (565).

La méthode d'IVIS est utilisé, non seulement dans le domaine d'infectiologie, mais aussi de l'oncologie. Plusieurs cellules tumorales transgéniques exprimant Gluc ont été conçues afin de permettre aux chercheurs de surveiller la croissance tumorale *in vivo*. En plus

de ce dernier, il a été montré que l'activité de Gluc secrétée dans le sang et l'urine par ces cellules cancéreuses reflétait la quantité de cellules cancéreuses viables dans les tumeurs primaires et métastatiques (566, 567). Des corrélations positives ont été aussi observées entre les titres viraux cérébraux du rVHS-1 et l'activité Gluc retrouvée dans l'urine et le plasma. Nous nous sommes rendus compte que ces corrélations étaient plus fortes, quand les données du J4 p.i étaient exclues. Il est possible que le Gluc produit par les cellules infectées par le rHSV-1 dans la cavité nasale finit par rejoindre le flux sanguin et biaise potentiellement ces corrélations. Enfin, pour démontrer que le rVHS-1 représente un outil idéal pour tester des nouveaux traitements contre l'EH, nous avons évalué l'impact du traitement avec VACV, en mesurant l'activité de Gluc. Les résultats de cette preuve de concept ont confirmé que la cinétique des valeurs du RLUs dans le plasma et les titres viraux dans le cerveau suivaient la même tendance.

Un nombre croissant d'études a démontré la perturbation de la BHE durant l'EH (205). Nous avons montré que l'utilisation du rVHS-1 offre une approche facile d'évaluation de la BHE, toute en visualisant et quantifiant le virus. La perméabilité de la BHE varie selon les différentes luciférases. Nous avons choisi la Gluc, car ni elle ni son substrat, sont capables de traverser la BHE (568, 569). En sachant que le rVHS-1 ne donne pas des infections systémiques, le signal bioluminescent détecté en dehors du cerveau correspondrait à Gluc secrété qui traverse la BHE perturbée, et s'accumule en périphérie. L'injection intrapéritonéale de CTZ a confirmé l'accumulation de Gluc dans différents organes périphériques, ce qui suggère que le Gluc produit dans le SNC peut facilement passer la BHE au J6. Suite à l'injection intraveineuse de CTZ, il n'y avait que le SNC qui émettait des photons. Ces observations ont suggéré que la vascularisation périphérique n'était pas affectée par l'EH, contrairement aux vaisseaux sanguins cérébraux qui laisse passer le CTZ et le Gluc. Cette perturbation a été également mise en évidence par le colorant de Bleu d'Evans. Au J4 p.i., la perméabilité de la BHE des souris BALB/c avait augmenté au niveau des bulbes olfactifs. Le colorant a été ainsi retrouvé dans le thalamus et le noyau paraventriculaire au J6 p.i. Enfin, la diminution de l'expression de claudine-5, qui est une protéine de JS, a confirmé la perturbation de la BHE chez la souris infectée au rVHS-1. En accord avec nos résultats, une étude a suggéré que le VHS-1 déclenche la réponse au stress de Golgi qui est impliquée

dans l'apoptose, qui à son tour entraîne une diminution d'expression d'occludine et de claudine-5 (570).

La perturbation de la BHE induit une infiltration non-contrôlée du parenchyme cérébral par les cellules immunitaires de la périphérie, au cours de l'EH. Ces cellules infiltrantes, essentielles pour le contrôle de l'infection, participent à la réponse immunitaire exacerbée qui rend la BHE encore plus perméable (571). La microglie, qui représente la première cellule immunitaire rentrant en contact avec des cellules du SNC infectées par le VHS-1, semble coordonner cette infiltration. Des altérations du nombre des cellules immunitaires infiltrantes en l'absence de microglie, a renforcé l'hypothèse de l'implication de la microglie dans le contrôle de l'infiltration du cerveau (356, 572). La réponse microgliale semble ainsi être responsable de la perméabilisation accrue de cette barrière. Les cytokines TNF- α , l'IL-1 β et l'IFN- γ produits par ces microglies stimulent l'expression d'ICAM-1 à la surface des cellules endothéliales, qui aide à l'infiltration des cellules immunitaires de la périphérie (573, 574). De plus, les microglies secrètent des MMPs qui clivent les protéines des JS (382). La NO produite par la microglie cause aussi la vasodilatation en induisant des arrangements du cytosquelette des cellules endothéliales (575, 576). Contrairement à ces effets néfastes de la réponse microgliale, plusieurs études ont aussi démontré l'importance de ces cellules dans le contrôle des infections du SNC (337, 577).

Dans le cadre de mon doctorat, nous avons exploré l'implication peu connue des microglies dans le contrôle de l'EH. En première partie, nous avons utilisé le M-CSF qui est une cytokine hématopoïétique impliquée dans le développement, la prolifération et le maintien des phagocytes mononucléaires, comme les monocytes/macrophages et les microglies. Cette cytokine active le CSF1R qui est un récepteur de la famille des tyrosine kinases, également connu sous le nom de CD115. Dans le SNC, l'axe MCSF/CSF1R est essentiel à la survie de la microglie et induit également leur prolifération, leur activité phagocytaire et leur différenciation vers un phénotype anti-inflammatoire (578). Notre collaborateur Dr Serge Rivest et son équipe ont déjà démontré que l'administration systémique de M-CSF active la prolifération microgliale et augmente leur capacité phagocytaire favorisant la dégradation de l'A β , qui finalement permet de prévenir le déclin cognitif associé à la charge d'A β dans un modèle murin de la MA (579). En se basant sur ce

dernier, nous avons également décidé d'utiliser le M-CSF afin de moduler la réponse immunitaire des microglies CSF1R⁺ et d'étudier l'effet de l'activation de l'axe M-CSF/CSF1R sur le contrôle de la réplication virale et de l'inflammation dans le cerveau, chez la souris BALB/c. Avant de commencer notre étude, nous avons évalué deux différentes stratégies d'administration i.e. en pré- et post-infection. Contrairement au prétraitement, la différence de la survie en traitement au J2 et J4 post-infection était non-significative. Ce résultat a montré que le M-CSF représente plutôt un outil pour les études de la réponse immunitaire qu'un traitement immunomodulateur potentiel contre l'EH. Cependant, différentes doses de M-CSF administrées par différentes voies pourraient toujours être testées en post-infection. Le prétraitement par le MCSF a entraîné une diminution significative des titres viraux au J6 p.i. et a amélioré la survie. Au J4 et J6 p.i., le nombre des microglies CD115⁺ totaux et microglies CD115⁺ CD68⁺ phagocytaires était 2 fois plus élevé dans le cerveau des souris traitées au M-CSF comparé au groupe contrôle, respectivement. Nos résultats suggèrent que la stimulation des microglies par le M-CSF déclenche leur prolifération et induit un phénotype phagocytaire. Similaire à nos observations, il a été rapporté que le traitement *in vitro* des microglies humaines par le M-CSF a induit l'augmentation de l'expression de PU.1 et DAP12, impliqués dans la prolifération cellulaire et la phagocytose, respectivement (580).

L'expression du CD68 par la microglie dans le cerveau atteint d'EH indique le phénotype phagocytaire de ces cellules. L'observation des englobements phagocytaires formés par la microglie et l'établissement des contacts directs entre les ramifications microgliales Tmem-119⁺ CD68⁺ et les cellules HSV-1⁺ ont suggéré que la phagocytose fait partie des mécanismes de contrôle microglial de l'EH. Une étude sur l'encéphalite au PRV a démontré que les microglies phagocytent les cellules infectées à la fois *in vitro* et *in vivo*. De plus, la diminution significative de l'expression du CD68 chez la microglie P2Y12^{-/-} a suggéré que l'activité phagocytaire de la microglie est dépendante de P2Y12 (343). En accord avec ces dernières, l'analyse ultrastructurale réalisée par notre équipe en collaboration avec l'équipe de Dre Marie-Ève Tremblay a révélé que la microglie présentait une activité phagocytaire accrue et une digestion extracellulaire au cours de l'infection à ZIKV (273). Enfin, Dr Paludan et son équipe a rapporté la présence des antigènes du VHS-1 dans la région extranucléaire des microglies/macrophages Iba1⁺ au niveau du tronc cérébral des souris infectées avec le VHS-1. Leurs résultats ont également suggéré la phagocytose des cellules

du SNC infectées avec le VHS-1 par la microglie (372). Malgré l'ensemble de ces données, aucun résultat nous permet de distinguer si la microglie phagocyte les cellules infectées au cours de l'EH ou bien qu'elle se fait infecter par le VHS-1. Il serait alors intéressant d'utiliser une souche recombinante de VHS-1 exprimant une protéine fluorescente résistante à la protéolyse comme le mCherry, afin de confirmer la présence de cette protéine rapporteuse dans le phagolysosome des microglies à l'aide de la microscopie confocale sur les coupes du cerveau des souris atteintes d'EH.

Les voies moléculaires de M-CSF restent toujours à élaborer. On sait que ce facteur de croissance se lie à son récepteur CSF1R, qui par la suite active PI3K et la phospholipase C γ (PLC γ). La molécule Rac appartenant à la famille Rho des GTPases, est activée via la voie de signalisation classique PI3K-dépendante. De plus, Iba1 exprimée par la microglie, améliore l'activation de Rac via une autre voie de signalisation dépendante de la PLC γ . Enfin, Rac coopère avec d'autres molécules pour réguler la transcription de plusieurs gènes ayant un impact significatif sur les réponses biologiques de la cellule (581). Il a été suggéré que les macrophages stimulés par le CSF-1 *in vitro* ont une plus grande capacité d'expression d'IFN- α/β , qui sont des médiateurs cruciaux dans le contrôle des infections (582, 583). En se basant sur l'ensemble de ces informations, nous avons donc décidé de quantifier les niveaux d'ARNm d'IFN- α/β et de cytokines/chimiokines dans les homogénats du cerveau entier au J4 et J6 p.i., par PCR numérique de gouttelettes (ddPCR) et Luminex, respectivement. L'augmentation significative des niveaux des transcrits d'IFN- β au J6 p.i. chez la souris prétraitée a suggéré que la stimulation de l'axe M-CSF/CSF1R pourrait permettre un meilleur contrôle de la réplication du VHS-1. Il a été montré que le traitement des monocytes par l'IFN-I induisait la réduction de l'expression de l'ARNm de M-CSF (584). Il serait intéressant d'étudier si l'IFN- β est surproduite à la suite de l'augmentation de concentration de M-CSF, ce qui permettrait de diminuer l'expression de M-CSF. Nos résultats montrant des niveaux d'IL-10, IL-13 et IFN- γ significativement plus élevés chez le groupe ayant reçu du M-CSF suggèrent ainsi que le M-CSF module la réponse inflammatoire. En accord avec nos données, une étude récente a rapporté que les microglies surexprimant le M-CSF avaient changé le niveau d'expression de plusieurs gènes impliqués dans la réponse immunitaire microgliale, sans avoir altéré l'expression des marqueurs du phénotype anti-inflammatoire, souvent défini comme « M2 ». Ils ont montré que ces microglies exprimaient plus TLR2,

CMH-I et d'autres gènes régulés par l'IFN, tels que les membres de la famille Oas, responsables de l'activation des fonctions antivirales cruciales suite à la reconnaissance des acides nucléiques double brin dans le cytosol. (585). Nous pensons que les propriétés anti-inflammatoires et antivirales de ces cytokines participent à l'amélioration de la survie chez les souris prétraitées par le M-CSF. Une expérience de FACS sur l'ensemble des cellules immunitaires incluant les microglies marquées pour ces cytokines, pourrait aider à identifier les populations responsables de cette réponse anti-inflammatoire.

L'administration de M-CSF avant l'infection a induit une augmentation du nombre des leucocytes infiltrants au J6 p.i. Les résultats de FACS ont démontré que le nombre de monocytes Ly6C⁺ était significativement plus élevé chez la souris prétraitée. En accord avec ce dernier point, il a été montré que le traitement quotidien par le M-CSF stimule la prolifération monocyttaire (586). En plus de ce dernier, M-CSF peut également induire des changements phénotypiques chez les monocytes/macrophages CSF1R⁺ et altérer leurs réponses contre le VHS-1, tel qu'observé chez la microglie (587). Alors, une étude de l'expression de certains gènes comme TNF- α , iNOS, IL-1 β pour un phénotype inflammatoire et IL-10, Arg-1 et Fizz1 pour un phénotype anti-inflammatoire sur les monocytes/macrophages isolés des cerveaux infectés au VHS-1 semble être nécessaire pour étudier l'effet de cette molécule sur le phénotype des monocytes/macrophages. Nous pensons qu'un milieu anti-inflammatoire favorisé par le M-CSF pourrait ainsi contribuer à l'amélioration du pronostic au cours de l'EH. L'infiltration monocyttaire élevée chez la souris prétraitée a mené à la question si les monocytes étaient responsables de la diminution des titres viraux cérébraux au J6 p.i. Au J8 p.i., nous avons également constaté une diminution du nombre de monocytes Ly6C⁺ et de neutrophiles Ly6G⁺ infiltrants chez la souris prétraitée au M-CSF. Les titres viraux inconnus de J8 p.i. compliquent l'interprétation de cette diminution d'infiltration, qui pourrait être expliquée par la diminution des titres viraux cérébraux.

La multitude de types cellulaires exprimant le CSF1R nécessite une caractérisation plus détaillée des cellules stimulées par le M-CSF, ce qui permettrait de comprendre si c'est un effet croisé de microglies et monocytes ou bien spécifique à un seul type de cellule. Pour distinguer l'impact des monocytes et des microglies, nous avons d'abord induit la déplétion

monocytaire chez la souris BALB/c par le traitement de clodronate-liposomale, au pic de l'EH correspondant au J6 dans notre modèle murin. Il ne faut pas oublier que la réaction immunitaire dans notre modèle de souris infectée par la voie intranasale s'initie au niveau de la muqueuse de la cavité nasale et que son altération pourrait ainsi mener à l'infection des cerveaux avec différentes quantités virales. Pour diminuer l'infiltration du SNC par les monocytes, sans avoir impacté le nombre de monocytes infiltrant la muqueuse nasale, nous avons choisi d'administrer la liposome-clodronate par la voie intraveineuse au J3 et J5. Nos résultats ont d'abord révélé que le traitement par le liposome-clodronate a causé l'augmentation des titres viraux des cornets nasaux au J6 chez les souris traitées, sans altérer la quantité virale dans le SNC au J4 ou au J6 p.i. Nous avons également démontré que les titres viraux cérébraux et la survie des souris n'ont pas été affectés par la diminution de l'infiltration monocytaire, ce qui a suggéré que les monocytes/macrophages infiltrants contribuent au contrôle de la réplication virale de façon moins importante que la microglie dans le cerveau. Il a été également montré par notre équipe que les monocytes périphériques CCR2⁺ sont nécessaires, mais que la microglie CX3CR1⁺ fonctionnelle est encore plus cruciale pour le contrôle de l'EH (384, 385).

En deuxième partie de cette étude, nous avons examiné l'implication microgliale dans l'EH à l'aide des souris CSF1R-loxP-CX3CR1-cre/ERT2 (récepteur d'œstrogène 2) traitées avec du tamoxifène. Cette lignée de souris transgéniques nous a permis d'induire la déplétion partielle des microglies, en déplaçant le CSF1R chez les cellules CX3CR1⁺. De plus, le nombre de monocytes CSF1R⁺ ne semble pas être affecté. Au J0 et J4 p.i., le nombre de microglies a été significativement plus élevé chez la souris WT que la souris KO déplétée de microglies. Au J6 p.i., nos données ont démontré que le nombre des microglies chez la souris WT a diminué et a atteint le même niveau que celui de la souris KO. L'apoptose des cellules immunitaires incluant les microglies dans des régions hautement infectées pourrait expliquer cette diminution du nombre de microglies (372, 588). Il a été ainsi démontré que l'autophagie dépendante de STING limite l'infection par le ZIKV dans le cerveau de la drosophile. Alors, il serait intéressant d'étudier l'autophagie microgliale capable de limiter la propagation du VHS-1 pour savoir si ce mécanisme est responsable de la diminution du nombre de microglies.

La mortalité significativement plus élevée chez la souris KO a souligné l'importance de la présence microgliale dans la phase précoce de l'EH. Tel qu'attendu, les titres viraux cérébraux des souris KO étaient significativement plus élevés, ce qui a suggéré que les microglies sont responsables de la clairance virale au cours de l'EH. En plus de la phagocytose, l'IFN de type-I produite par les microglies est capable d'inhiber la réplication virale. Il a été montré que l'IFN-I promeut l'oxydation des acides gras et la phosphorylation oxydative, exerçant un effet antiviral dépendant de PPAR- α . De plus, l'activation du IFNAR induit l'expression des gènes stimulés par l'IFN (ISG), interférant avec la réplication virale et favorisant la clairance virale (589). L'effet antiviral d'IFN de type-I produit par les microglies surexprimant l'IRF7, a été également rapporté dans un modèle murin de l'encéphalite au VSV. Cette étude a suggéré que l'IFN produite par les microglies limitait la propagation transsynaptique du VSV (590). En 1992, une étude a également rapporté la réduction de la mortalité chez les enfants atteints d'une encéphalite focale sévère traitée par la combinaison d'acyclovir et de l'IFN- β (591). Pour savoir si le nombre de microglies réduit altérait l'expression d'IFN-I, nous avons quantifié l'ARNm d'IFN-I dans les cerveaux des souris WT vs KO. Nos résultats ont révélé que le niveau d'expression d'ARNm d'IFN- β était significativement moins important chez la souris déplétée des microglies au J4 p.i. Cette diminution d'expression était ainsi corrélée avec le nombre de microglies réduit au J4 p.i., ce qui a suggéré que les microglies sont responsables de produire de l'IFN- β dans la phase précoce de la maladie. De plus, l'observation de la réduction simultanée du niveau d'expression d'IFN- β et du nombre de microglies chez la souris WT au J6 p.i., où un nombre important de cellules immunitaires infiltre le SNC, a renforcé l'hypothèse que les microglies produisent la majorité d'IFN- β au cours d'EH. Il ne faut pas oublier que les niveaux d'ARNm ne sont pas toujours corrélés avec la quantité de protéine synthétisée. Alors, il serait nécessaire de doser l'IFN- β dans les surnageants des cerveaux, afin de pouvoir confirmer notre hypothèse.

Nous avons par la suite comparé les concentrations de cytokines/chimiokines dans les cerveaux des souris CSF1R WT vs KO au cours de l'EH. Contrairement aux niveaux d'IFN- β , il n'y avait pas de différence significative pour aucune des cytokines/chimiokines au J4 p.i. Malgré les différences non-significatives, nous avons remarqué que les concentrations de CCL2 et G-CSF étaient 4 fois plus élevées chez les souris KO. La propriété

anti-apoptotique de G-CSF, qui active Bcl-2 via la voie de signalisation JAK/STAT, a été démontrée dans un modèle murin d'ischémie cérébrale aiguë (592). Nous pensons que la mort microgliale accompagnée par les neurones infectés apoptotiques au J4 p.i. peut entraîner cette hausse de concentration de G-CSF. Le rôle primordial de CCL2 dans le recrutement des leucocytes dans le SNC est bien connu. Notre équipe a déjà rapporté que la déplétion de CCR2, le récepteur de CCL2, au niveau de la périphérie provoquait une mortalité accompagnée de titres viraux cérébraux plus élevés comparativement aux souris WT (384, 593). Une étude sur le modèle murin d'encéphalite au TMEV a démontré que les neurones semblent être la source majeure de CCL2 (594). Nous suggérons que les cellules du SNC incluant les neurones infectés augmenteraient la production de CCL2 au J4 p.i. afin de recruter un nombre de monocytes/macrophages plus élevé pour compenser l'absence des microglies dans les cerveaux des souris déplétées en microglie. Au J6 p.i., les concentrations de 16 des 20 cytokines/chimiokines dans le SNC étaient significativement plus élevées chez les souris KO. Cette observation a indiqué que les microglies nécessaires pour la clairance virale sont ainsi cruciales pour contrôler la réponse inflammatoire et éviter la neuroinflammation. Similaire à notre observation, l'expression de plusieurs gènes, tels que CCL2, CCL7, CXCL9, et CXCL10 étaient plus élevés dans les cerveaux des souris traitées par le PLX5622 (inhibiteur de CSF1R), comparé aux souris contrôles au cours de l'encéphalite au WNV. Au contraire, une autre étude sur l'encéphalite au PHEV (pour « *Porcine hemagglutinating encephalomyelitis virus* »), qui est un coronavirus hautement neurotrope, a rapporté la diminution significative de l'expression de plusieurs cytokines pro-inflammatoires, telles que IL-1 β , IL-6, TNF- α , et IFN- γ (595, 596). La déplétion microgliale à l'aide de PLX5622 dans un modèle d'infection du SNC par le SRAS-CoV-2 a confirmé cette réduction d'expression des cytokines/chimiokines pro-inflammatoires (596). Tous ces résultats montrent d'abord que l'absence de la microglie affecte différemment la réponse inflammatoire dépendamment du virus infectant le SNC. Enfin, les microglies semblent plutôt inhiber l'exacerbation de l'inflammation, au lieu de produire la majorité de ces cytokines/chimiokines au cours de l'EH.

La microglie joue un rôle essentiel dans le recrutement des cellules immunitaires infiltrantes de la périphérie au niveau du SNC. Plusieurs études ont rapporté que cette infiltration leucocytaire CD45⁺ dans la phase précoce de l'infection est importante pour le

contrôle de l'EH (154, 159, 395, 449). Cependant, une perte de contrôle dans la phase tardive pourrait également aggraver l'inflammation, endommager la BHE et détériorer le pronostic de cette infection. Dans notre étude, la déplétion microgliale a altéré le profil des cellules infiltrantes dans le SNC. Malgré des concentrations plus importantes de chimiokines comme CCL2 chez la souris CSF1R KO, le nombre de monocytes Ly6C⁺ infiltrants dans les cerveaux des souris CSF1R KO était plus élevé chez la souris WT au J6 p.i. Ce résultat montrant l'implication microgliale dans le recrutement des monocytes suggère aussi que CCL2 n'est pas la seule chimiokine à être responsable du recrutement monocyttaire au cours de l'EH. Il a été suggéré que le TNF- α produit au cours de l'infection au WNV est nécessaire pour le recrutement des monocytes/macrophages inflammatoires impliqués dans le contrôle de l'infection virale. La même étude a démontré que le traitement de ces souris avec des anticorps neutralisants contre TNF- α a diminué l'infiltration des monocytes/macrophages et a augmenté la mortalité (597). Une autre étude sur un modèle murin de lésion cornéenne a rapporté que les microglies réactives libèrent du TNF- α , impliqué dans le recrutement des monocytes. D'après cette étude, une seule injection intrapéritonéale d'anticorps monoclonaux de TNF- α est capable d'induire une réduction significative de l'infiltration monocyttaire dans la rétine (598). Dans notre étude, la concentration de TNF- α était légèrement plus élevée chez la souris CSF1R WT comparé à la souris déplétée des microglies au J4 p.i. Nous pensons que l'absence de la microglie sécrétant du TNF- α dans la phase précoce de l'EH chez la souris KO pourrait provoquer une baisse de l'infiltration des monocytes, qui semblent être nécessaires pour un meilleur contrôle de l'infection. Il serait alors intéressant d'étudier l'implication de l'axe TNF- α /TNFR et autres dans le recrutement des monocytes au cours de l'EH.

L'autre population infiltrante affectée par la déplétion microgliale sont les LT CD3 ϵ^+ . Il a été démontré que les microglies et les macrophages du SNC jouent un rôle dans la promotion de l'infiltration des LT CD8⁺ dans le SNC infecté au TMEV, d'une manière dépendante de la présentation d'antigène. Ces lymphocytes cytotoxiques produisant de l'IFN- γ semblent induire la mort des cellules infectées suite à la reconnaissance des antigènes viraux présentés au CMH-I sur plusieurs types cellulaires du cerveau (599). Les chimiokines, telles que CCL2, CCL5 CXCL10 et CXCL12 sont impliquées dans le recrutement des LT au SNC (600). Malgré les concentrations plus élevées de

cytokines/chimiokines, l'infiltration de LT était moins importante chez la souris CSF1R KO au J6 p.i., comme l'infiltration monocytaire. Pour comprendre l'origine d'une infiltration de LT plus élevée en présence de signal chimiotactique diminué, il serait d'abord nécessaire de mesurer la quantité des autres chimokines, comme CXCL10 et CXCL12, qui ne faisaient pas partie de notre panel de médiateurs étudiés. Des études ont également suggéré que l'interaction des récepteurs des intégrines exprimés par les macrophages résidents du SNC et les intégrines des LT, comme VLA-4 et LFA-1, peut faciliter l'infiltration des LT au niveau du cerveau (394). L'autre possibilité serait la perturbation de la BHE chez la souris CSF1R WT. Il a été montré que l'augmentation de l'expression de MMP-9 par la microglie dans la phase précoce de l'EH perturbe la BHE et facilite l'infiltration immunitaire (382). Il serait intéressant de comparer la perméabilité de la BHE chez la souris WT et KO à différents temps au cours de l'infection.

L'ensemble de notre deuxième étude a confirmé que les microglies jouent un rôle majeur dans le contrôle de l'EH. Une des limitations importantes de cette étude est l'utilisation de deux lignées de souris BALB/c et C57BL/6, qui ont des réponses immunitaires différentes et des niveaux de résistance variables contre le VHS-1, ce qui complique l'interprétation et la comparaison des résultats des deux parties. Une autre limite est l'utilisation des souris de l'âge variable entre 4 à 6 semaines. Nous suggérons que l'utilisation des souris âgées de 6 semaines pourrait harmoniser la réponse immunitaire de chacune des souris et diminuer la variabilité des valeurs obtenues. Une étude sur l'impact de la déplétion microgliale induite par PLX5622 dans l'EH a confirmé que ces cellules sont essentielles pour la survie. La même étude a également rapporté des différentes cinétiques d'infiltration pour les LT et les neutrophiles en absence de la microglie, comparés à nos résultats (386). Alors, il serait intéressant d'utiliser des inhibiteurs du CSF1R, comme une des molécules de la famille PLX provoquant la déplétion complète des microglies, dans notre modèle, afin de confirmer nos résultats et puis de vérifier que ces différentes observations sont dues à des différences dans les approches expérimentales. Malgré ces limitations, nous avons pu démontrer l'impact de l'activation et de l'absence de microglie dans l'EH, à l'aide de l'administration du M-CSF et la déplétion du CSF1R.

L'activité microgliale semble être essentielle dans la phase précoce de l'EH. Cependant, les mécanismes exploités par les microglies restaient toujours inconnus dans le contexte de l'EH. Dans la troisième partie de mon doctorat, nous avons décidé d'identifier les voies de signalisations activées par ces microglies situées dans des régions du SNC riches en foyers d'infection du VHS-1. Pour ce faire, nous avons décidé d'utiliser la nouvelle technologie de séquençage de cellule unique permettant une analyse transcriptomique individuelle de chacune des microglies. En sachant que la nature de l'EH plutôt focale que disséminé, nous avons considéré qu'étudier une seule région spécifique pourrait nous apporter plus d'information sur la réaction de la microglie contre les cellules infectées par le VHS-1. Une autre raison pour laquelle on a choisi de travailler sur une région spécifique est l'hétérogénéité microgliale (601). Ce phénomène n'est pas limité à la densité et au phénotype. Ces cellules peuvent exprimer plusieurs différents gènes en fonction de la région du SNC dans laquelle elles se situent. Une étude récente réalisée sur 255 échantillons de microglies humaines primaires isolées à l'autopsie de diverses régions cérébrales de 100 individus a confirmé que certaines voies, telles que les voies de signalisation de la Reeline, de l'IFN et des glucocorticoïdes étaient impliquées dans la régulation de cette hétérogénéité régionale (602). En sachant que la réponse immunitaire microgliale varie dépendamment de la région, nous sommes arrivés à la conclusion qu'il serait préférable d'étudier des régions spécifiques du cerveau. Dans cette partie de nos études, nous avons classifié les souris en fonction des symptômes d'EH, qui corrèlent avec les titres viraux dans les cerveaux. Cette corrélation nous permet d'estimer facilement le degré d'infection des souris. En fonction de ce dernier, les souris à prélever ont été divisées en deux groupes majeurs, que sont les souris modérément infectées et les souris très infectées.

La première étape de ce projet était de choisir la journée de prélèvement et la région du SNC à analyser. Dans notre modèle de souris C57BL/6N infectée par la voie intranasale, le J6 p.i. associé à de la mortalité accompagnée d'une augmentation significative des titres viraux, est considéré comme le pic de l'infection. Pour le choix de la région, nous avons d'abord utilisé le rVHS-1 avec le gène rapporteur *Gluc* et *tdTomato*, que nous avons généré, afin d'étudier les régions infectées chez l'animal vivant à l'aide d'IVIS. Au J6 p.i., le signal du diencéphale était plus intense que celui des bulbes olfactifs qui sont considérés comme la première région à être infectée par le VHS-1 administré par la voie intranasale. Cette

observation a indiqué que soit le VHS-1 infecte le thalamus plus tôt que les autres zones, soit la réponse immunitaire dans les bulbes olfactifs est plus efficace pour contrôler l'infection virale. Il a été déjà montré que la densité de marquage F4/80⁺ était plus élevée dans le bulbe olfactif que le thalamus et l'hypothalamus chez la souris. Cependant, une étude récente chez l'Homme a découvert que le thalamus accueillait des microglies ayant un phénotype plus réactif et exprimant des niveaux plus élevés de marqueurs comme CD68, CD45, CX3CR1, CD11c et HLA-DR (304). Autrement, des études chez les rongeurs ont aussi suggéré que le VHS-1 peut voyager le long des nerfs trijumeaux ganglionnaires se projetant vers les noyaux trijumeaux situés dans le tronc cérébral et ensuite infecter le thalamus pour finalement atteindre le cortex sensoriel (134). Les atteintes thalamiques sont rares, mais existent chez l'Homme (603, 604). Enfin, les titres viraux quantifiés dans différentes régions du cerveau et une étude supplémentaire d'IF ont permis de confirmer que le thalamus et surtout le noyau postéro-ventral du thalamus (VPL) était infecté par le VHS-1.

Avant d'aller isoler les microglies, nous avons encore une fois caractérisé l'infiltration au pic de l'infection du SNC. Nos résultats montrant la présence de neutrophiles, monocytes/macrophages et LT, et ont ainsi révélé la diminution du nombre de microglies au J6 p.i. comparé à celle quantifiée chez la souris non-infectée. En accord avec ces observations, les analyses d'IF avec le marquage TMEM119 sur les coupes de cerveaux provenant des souris très infectées ont montré la réduction, voir l'absence de signal dans le VPL de ces souris. Tel que mentionné avant, l'apoptose de ces cellules de façon dépendante de cGas a été déjà démontrée dans des régions hautement infectées avec le VHS-1 (372). La réduction du nombre des microglies a été constatée aussi au cours de l'infection du SNC au WNV (605). D'après cette étude, les microglies ont changé de morphologie et acquièrent un phénotype spécifique à l'infection, toujours variable entre les cellules en fonction de la région dans laquelle elles se trouvent. La même étude a enfin démontré l'apoptose de ces microglies, suite à une diminution de l'expression de plusieurs gènes comme CX3CR1, F4/80 et TMEM119, souvent utilisés pour identifier les microglies. Ces observations montrent la difficulté de déterminer si la perte microgliale est due à la mort cellulaire ou bien au changement phénotypique et soulignent le besoin d'identifier des nouveaux marqueurs spécifiques microgliaux. Nous pensons qu'une approche protéomique pourrait aider à découvrir des marqueurs potentiels et étudier la variation de synthèses protéiques au cours

de l'infection au VHS-1. Pour ce faire, des microglies primaires isolées de la souris, mises en co-culture avec ces neurones ou astrocytes infectés, pourraient être analysées par la spectrométrie de masse à des différents temps au cours de l'infection pour identifier les marqueurs stables qui seront par la suite testés et validés *in vivo*. Récemment, il a été rapporté que les monocytes infiltrants peuvent aussi exprimer *Tmem119*, qui était considéré spécifique à la microglie (605, 606). En sachant les niveaux importants d'infiltration monocyttaire dans notre modèle murin d'EH, nous avons décidé d'utiliser l'appellation « *microglia-like* », afin de regrouper toutes les cellules génotypiquement et/ou phénotypiquement similaire à la microglie, qui exprimant le *Tmem119* ou produisant le TMEM119.

Nos études d'IF sur les VPL modérément infectées ont suggéré que les microglies TMEM119⁺ CD68⁺ démontraient une activité phagocytaire. Les régions modérément infectées accueillait ces microglies réactives autour des cellules infectées. Les analyses ultrastructurales de VPL à l'aide de la microscopie électronique, ont révélé que ces cellules « *microglia-like* » contiennent des endosomes VHS-1⁺, ce qui a suggéré que ces cellules participent à la clairance virale *via* la phagocytose des cellules infectées. Une étude récente sur l'encéphalite au TMEV a démontré que les cellules myéloïdes du SNC phagocytent les cellules infectées et présentent les antigènes viraux aux LT CD8⁺, surtout via le H-2K^b de la famille de CMH-I. D'après la même étude, la déplétion de H-2K^b chez les microglies et macrophages CX3CR1⁺ a perturbé l'activation lymphocytaire et a ainsi causé une réduction du nombre des LT CD8⁺ infiltrants (599). Dans notre étude, nous avons également visualisé des microglies en contact avec les LT CD3ε⁺ infiltrants. De plus, la membrane des cellules « *microglia-like* » VHS-1⁺ observée durant les analyses de microscopie électronique, a souligné la possible contribution de ces cellules au déclenchement de la réponse adaptative. L'hypothèse alternative pour expliquer ces observations est l'infection des cellules « *microglia-like* » avec le VHS-1. L'endocytose des virions imitant de nombreuses caractéristiques de la phagocytose représente un des modes d'absorption par lequel le virus peut infecter les phagocytes professionnels et non-professionnels (607). En accord avec ce dernier point, une étude a rapporté le VHS-1 attaché à la membrane plasmique qui se fait internaliser par l'absorption de type phagocytose impliquant un réarrangement du cytosquelette d'actine et le trafic des virions dans des grandes vésicules de type phagosome. Ensuite, la liaison et la fusion de l'enveloppe du virion avec la membrane phagosomale

facilitée par la nectine-1 permet au virus d'être libéré dans le cytoplasme (608). En se basant sur ces derniers, nous considérons que les cellules « *microglia-like* » avec des endosomes contenant des virions pourraient ainsi correspondre aux microglies infectées. Enfin, l'analyse de nos données de séquençage montrant l'expression des ARNm viraux dans certaines des microglies a renforcé cette hypothèse. Tel que mentionné dans le Chapitre-III, la détection des ARNm viraux spécifiquement dans les noyaux de ces cellules « *microglia-like* » à l'aide du séquençage d'ARN à noyau unique permettrait de prouver l'infection de ces cellules avec le VHS-1.

Nous avons constaté que le nombre de cellules TMEM119⁺ diminuait simultanément avec l'augmentation du nombre de cellules marquées pour le VHS-1. L'analyse des VPLs hautement infectés a révélé que les cellules « *microglia-like* » TMEM119⁺ encerclaient les foyers infectieux, mais n'étaient pas capables d'avancer vers les cellules infectées du SNC afin d'établir un contact direct nécessaire pour la phagocytose. De plus, le signal de CD68 était quasi-absent chez ces cellules TMEM119⁺ autour des foyers infectieux dans les VPLs hautement infectés, ce qui signifie une perte d'activité phagocytaire. Cette observation a également montré que l'amélioration du pronostic de l'EH à la suite du prétraitement avec le M-CSF provoquant l'augmentation du nombre de microglie CD68⁺ au J6 p.i., pourrait être due à cette restauration de l'activité phagocytaire. Nos analyses qualitatives sur les images de microscopie électronique des VPL ont ainsi permis de mettre en évidence la perturbation des voies phagolysosomales en montrant la diminution du nombre d'endosomes précoces chez ces cellules « *microglia-like* ». Nous avons d'abord pensé que cette diminution pourrait faire partie des systèmes de défense des microglies afin d'éviter de se faire infecter par le VHS-1 en exploitant les endosomes pour rentrer dans la cellule. Cependant, une étude récente a observé également une diminution du nombre de lysosomes et de l'activité phagocytaire des microglies situées dans des régions ischémiques du cerveau (609). D'après cette étude, l'expression altérée de plusieurs gènes impliqués dans l'autophagie comme ATG4 and Beclin-1, qui sont aussi impliqués dans la phagocytose, perturbent l'activité phagocytaire des microglies. De plus, ces dernières avaient une mobilité réduite, ce qui rappelle nos observations des microglies TMEM119⁺ incapables de migrer vers les cellules VHS-1+ dans des VPL hautement infectés. Ces observations suggèrent que l'activité phagocytaire réduite chez la microglie dans les VPL hautement infectés pourrait également être due à la

perturbation des voies impliquées dans l'autophagie par le VHS-1. La même étude a suggéré que le traitement avec la rapamycine, un inducteur d'autophagie, avait partiellement amélioré l'activité phagocytaire de ces microglies. Notre équipe a aussi rapporté l'amélioration du pronostic de l'EH par une combinaison du valacyclovir et la rapamycine (610). Il serait alors intéressant d'étudier l'effet de la rapamycine sur la microglie au cours de l'EH, afin de mieux caractériser les phénomènes derrière cette amélioration de survie.

Les analyses d'IF des VPLs hautement infectées ont révélé une forte augmentation d'expression du CD68, malgré la phagocytose perturbée chez la microglie TMEM119⁺. Cette expression élevée du CD68 accompagnée d'une diminution du nombre de microglies a suggéré qu'il existe d'autres cellules résidentes du SNC ou bien les cellules immunitaires infiltrantes, qui essaient de compenser le manque de clairance virale et/ou des débris de cellules mortes causé par l'activité phagocytaire réduite. Il a été déjà démontré que le pouvoir des astrocytes à phagocyter peut émerger lors d'une diminution du nombre ou de l'activité de la microglie (611). Cependant, le marquage d'IBA-I sur les VPLs infectées a révélé la co-localisation de ce marqueur avec le CD68, ce qui a suggéré que ces cellules ayant une activité phagocytaire élevée correspondraient aux monocytes/macrophages infiltrants ou bien à des cellules « *microglia-like* » qui ont réduit l'expression du TMEM119. Le même phénomène observé au cœur des VPLs hautement infectées se passe également dans des régions ischémiques du cerveau (612). Durant cette pathologie, les monocytes infiltrants migrent vers le cœur de la région affectée. L'altération du métabolisme énergétique et la grande quantité d'ATP libérée au cours de l'ischémie cérébrale active également la microglie. Ces dernières situées autour de la zone ischémique restent ramifiées et diminuent l'expression de CD68, contrairement à celles situées au cœur de la zone affectée qui acquièrent une forme amiboïde en continuant d'exprimer CD68. D'après ces informations, une partie de ces cellules IBA-I⁺ CD68⁺ peuvent ainsi correspondre à des monocytes/macrophages infiltrants. En plus, plusieurs études ont également montré que les monocytes infiltrants peuvent adopter certaines caractéristiques de la microglie et repeupler les régions déplétées de microglies (413, 613).

Pour vérifier ces hypothèses, il faut des marqueurs spécifiques aux microglies et monocytes/macrophages. Leurs phénotypes similaires compliquent la caractérisation du rôle

exact de ces cellules dans l'EH. Nos analyses ont révélé plusieurs gènes surexprimés spécifiques à chacune de ces deux populations, comme le *Siglech* et *Chil3* pour la microglie et le monocyte/macrophage, respectivement. Ces gènes et leurs formes protéiques pourraient être étudiés plus en détail, afin de trouver des combinaisons de marqueurs permettant de distinguer ces monocytes/macrophages des microglies. L'autre approche serait d'utiliser des souris chimériques ayant des monocytes exprimant un fluorochrome détectable par la cytométrie en flux, qui permettrait de séparer et trier ces monocytes/macrophages infiltrants et les microglies. À la suite de cette étape, le séquençage de l'ARN de cellule unique de ces cellules triées pourrait nous aider à trouver des marqueurs alternatifs et mieux étudier le rôle exact de chacune de ces cellules. De plus, cette approche permettrait de valider nos « *cluster* » de cellules, que nous avons déterminés de façon manuelle, en analysant l'expression de certains gènes bien connus à l'aide du logiciel LoupeBrowser®.

Dans cette troisième partie, notre but était de séquencer l'ensemble des microglies isolées à partir de la région thalamique enrichie en noyau postéro-ventral (NPV) des souris C57BL/6N infectées par voie intranasale par le VHS-1, afin d'identifier les mécanismes exploités par ces cellules qui permettraient de mieux définir leur rôle dans la pathogenèse de l'EH. Tels que mentionné précédemment, un nombre important de cellules immunitaires incluant les monocytes/macrophages exprimant des marqueurs communs avec les microglies, infiltrent le SNC (614). Ce phénomène complique l'isolement des microglies et nous empêche d'isoler uniquement les microglies. Dans notre étude, nous avons isolé ces cellules à l'aide des billes magnétiques de CD11b, qui a mené à l'isolement des autres cellules immunitaires en même temps que les microglies. En sachant que les microglies changent leur phénotype au cours de l'infection, nous assumons que notre approche d'isoler une multitude de cellules a permis de ne pas manquer certaines microglies qui auraient possiblement changé de phénotype. Les analyses de séquences de l'ensemble de 7658 cellules collectées de trois cerveaux infectés avec un titre viral différent au J6 p.i. et 2 souris contrôles non-infectées, ont suggéré la présence de 10 populations cellulaires distinctes. Nous avons constaté que la distribution des principaux clusters pour chacun des échantillons infectés dans la représentation bidimensionnelle UMAP (pour « *Uniform Manifold Approximation and Projection* ») (td-UMAP) des données agrégées de scRNA-seq était différente. Nous supposons que le titre viral différent dans le SNC de chaque souris a provoqué de

l'inflammation à différent degré ce qui a causé une distribution différente de ces clusters. Les cellules immunitaires ont été partitionnées dans les sous-clusters en fonction de l'expression de différents gènes, tout en prenant en compte de cette différence des titres viraux favorisant différents niveaux d'inflammation. À la suite de l'observation des chevauchements entre certains clusters comme la microglie réactive et les M2, nous avons pensé que cela pourrait être dus au « *effet de lot* » (pour « *batch effet* ») que notre approche de regrouper les cellules manuellement pourrait entraîner. Cet effet de lot se produit lorsque la variation entre les différents groupes d'échantillons est causée par la technique d'analyse choisie plutôt que par des raisons biologiques, ce qui conduit à de fausses conclusions. Pour éviter de faire des conclusions erronées, nous avons effectué la correction de l'effet de lot avec l'intégration de Seurat sur nos données qui nous a montrée que ces chevauchements n'étaient pas dus à l'effet de lot.

L'analyse des résultats de scRNA-seq a d'abord révélé trois sous-population microgliales, qui sont les microglies surveillantes, les microglies réactives et les microglies réactives en prolifération. Les voies de signalisations chez ces sous-clusters microgliaux ont été évaluées à l'aide de la base de données Reactome pour mieux comprendre les fonctions de ces cellules dans l'EH. Tout d'abord, nos résultats ont confirmé que les microglies prolifèrent lors de l'EH, tel que démontré par Chhatbar *et al.* (615). Cette étude sur l'encéphalite au VZV avait également démontré que les monocytes Ly6C⁺ infiltrants ne donnaient pas naissance à des microglies. Les microglies réactives en prolifération dans le cerveau infecté avec le VHS-1 exprimaient des gènes des cytokines/chimiokines pro-inflammatoires. Alors, il se peut que ces cellules contribuent à la réponse inflammatoire délétère. Nous pensons qu'il serait nécessaire d'évaluer l'effet de l'inhibition de la prolifération microgliale, sans induire leur déplétion, sur la production de cytokines inflammatoires. En accord avec ce dernier point, il a été montré que la prolifération microgliale bloquée à l'aide du traitement roscovitine, un inhibiteur du cycle cellulaire, entraînaient une neuroprotection dans un modèle murin d'ischémie cérébrale. Il a été suggéré que cette neuroprotection était médiée par l'inhibition de la production de cytokines inflammatoires, telles que IL-1 β , CCL3 et NO (616). Les microglies réactives ont surexprimé les gènes impliqués dans la dégradation des ARNm non-sens (NMD) (pour « nonsense-mediated decay »). Il a été démontré que l'abrogation de NMD aboutit à la régulation à la

hausse des protéines virales durant les infections au virus de la forêt de Semliki (SFV) et au virus Sindbis (SINV) (617, 618). Alors, ce mécanisme pourrait également être exploité par la microglie pour bloquer la réplication virale et éviter son infection au cours de l'EH. Nos résultats ont ainsi suggéré que la reconnaissance du VHS-1 est médiée par le TLR endosomal, ce qui serait en accord avec les endosomes des microglies VHS-1⁺ observées en microscopie électronique. On sait que l'ADN viral du VHS-1 est détecté par le TLR9 endosomal, suivi de l'activation du cGAS et de la protéine adaptatrice STING (619, 620). Le VHS-1, situé dans l'endosome à la suite de son internalisation par la microglie pourrait s'échapper de l'endosome et se retrouver dans le cytoplasme avant de migrer vers le noyau de la cellule où l'ADN viral est répliqué. Nous présumons que la différenciation des microglies réactives vers les microglies « *en transition* », qui étaient désignées comme la quatrième sous-population microgliale, pourrait se dérouler à la suite de cet échappement des virions. La microglie « *en transition* » pourrait correspondre à la réponse transcriptionnelle de la microglie réactive infectée avec le VHS-1. L'expression élevée des gènes comme *Mda5*, *DDX58*, *Lgp2*, *Isg15*, *Acod1*, *Rsad2* et *Hcar2*, impliqués dans la reconnaissance virale et la réponse antivirale, en même temps que les ARNm du VHS-1 suggère l'infection de microglie des VPL par le VHS-1. La détection des hauts niveaux d'ARNm viraux dans ces cellules fait penser aussi que cette observation pourrait provenir du séquençage du matériel génétique des virions phagocytés. Cependant, le marquage du VHS-1 détecté sur des cellules TMEM119⁺CD68⁻ a suggéré que ces cellules semblaient être infectées plutôt que phagocytaires. Tel que mentionné dans la discussion du Chapitre-IV, le séquençage d'ARN à noyau unique permettrait de confirmer la présence d'ARN viraux dans le noyau de la cellule, ce qui montrerait que la cellule est infectée. De plus, une étude supplémentaire de la colocalisation des protéines impliquées dans la fonction endolysosomale et celle du VHS-1 en immunofluorescence sur des coupes du cerveau semble nécessaire pour distinguer la phagocytose d'une infection. Le faible niveau d'expression d'ARNm du VHS-1 par les Mono2 hautement phagocytaires a renforcé notre hypothèse d'infection de ces microglies "en transition". Alors, la déplétion spécifique de ces cellules uniquement détectables au pic de l'infection pourrait diminuer les titres viraux et améliorer le pronostic de l'EH.

L'analyse du cluster de microglie « *en transition* » a montré qu'elles étaient hautement enrichies en plusieurs gènes associés aux neutrophiles, comme *Retnlg*, *Asprv1*,

Il1f9 et *Cxcr2*. Il a été montré que la microglie interagit avec ces cellules immunitaires infiltrantes via les intégrines et les lectines, avant de les phagocyter pour limiter l'inflammation dans le SNC (407). Il serait alors intéressant d'étudier la phagocytose des neutrophiles par les microglies au cours de l'EH, par différentes techniques d'imagerie. Ces dernières permettraient de savoir si ces gènes associés aux neutrophiles sont vraiment exprimés par ces microglies ou bien ce sont du matériel génétique des neutrophiles phagocytés par ces microglies. Notre décision de définir ce cluster, tel qu'une sous-population microgliale, était basée sur l'expression élevée des gènes associés aux microglies, comme *P2ry12*, *Tmem119*, *Fcrls* et *Csf1r*. Une surexpression de gènes comme *Fas*, *Tnf* et *Nlrp3*, impliqués dans la signalisation TNF et NLR a été observée chez ce cluster. Nous avons également constaté un enrichissement significatif des gènes comme *Cflar*, *Fas* et *Mkl1* impliqué dans la nécroptose. Similaire à notre observation, une étude sur la dégénérescence rétinienne avait ainsi proposé l'exacerbation de l'inflammation dans la rétine par les microglies activées via TLR-4, qui rentrent en nécroptose et libèrent plusieurs cytokines pro-inflammatoires, telles que TNF- α (621). La même étude a rapporté l'inhibition de la nécroptose de ces microglies et le retard de la production des médiateurs inflammatoires suite au traitement par la necrostatin-1, ce qui serait intéressant de tester dans l'EH. L'ensemble de nos résultats révèle que cette sous-population de « *microglia/microglia-like cells* » infectée par le VHS-1 détecte la présence virale à l'aide de capteurs ADN/ARN cytosoliques dans le VPL, puis elle adopte un phénotype neurotoxique produisant de l'IL-1 β et du TNF- α , qui pourraient aggraver le pronostic de l'EH. Plusieurs études ont rapporté des résultats similaires qui montrent la présence des microglies neurotoxiques (622, 623). Ces dernières qui libèrent du TNF- α , de l'IFN- γ et ROS contribuant à la mort des cellules neuronales, ont été rapportées par une étude sur l'encéphalite au JEV. Les microglies CCR9⁺ ACOD1⁺, résistantes à l'apoptose, semblent contribuer à la neuroinflammation chronique en produisant des niveaux élevés de TNF- α dans le SNC de souris infectées par *Toxoplasma gondii* (534). L'expression du NLRP3 et de la caspase-1 et la production d'IL-1 β ont été également observés chez les microglies exposées à la gp120 du VIH-1 (624, 625). Enfin, un autre article récent, en accord avec nos résultats, a rapporté que les inflammasomes contribuent à l'inflammation pathogène dans l'EH (375). Hayes *et al.* ont ainsi démontré que l'effet néfaste de l'activité des inflammasomes sur la survie était indépendant de la réplication virale.

Dans notre étude, nous avons suggéré que l'un des principaux médiateurs de cette production exacerbée d'IL-1 sont les cellules de type microglie "en transition". Pour visualiser ces cellules « *en transition* », nous avons fait des analyses d'IF sur les VPLs hautement infectées. Les cellules TMEM119⁺ IBA-I⁺ ramifiées ont été observées à proximité de zones hautement infectés. Conformément aux résultats transcriptomiques, ces cellules étaient aussi NLRP3⁺, IL-1β⁺ et VHS-1⁺. Nous pensons qu'il est nécessaire de continuer d'étudier l'impact de la production d'IL-1β médiée par le NLRP3-inflammasome chez les microglies dans l'EH. Plusieurs études ont rapporté l'activation des inflammasomes suite à l'infection par le VHS-1. Une étude récente a confirmé que le VHS-1 déclenche la pyroptose dépendante de la Gasdermine D en activant NLRP3 chez la microglie, conduisant à la production de caspase-1 et d'IL-1β active. Alors, il serait intéressant d'étudier l'impact de l'inhibition de l'activation de l'inflammasome et aussi de la pyroptose microgliale sur le pronostic de l'EH (626). Notre équipe a précédemment montré que les souris IL-1β^{-/-} avaient une survie significativement plus faible et des charges virales cérébrales plus élevées que les souris WT (627). De plus, la production d'autres molécules pro-inflammatoires était perturbée dans le cerveau des souris IL-1β^{-/-}. Nous pensons que la production d'IL-1β est cruciale dans la phase initiale de l'EH. Cependant, cette réponse inflammatoire médiée par cette sous-population de microglie « *en transition* » devient incontrôlée au pic de l'infection et détériore le pronostic de l'EH. À notre connaissance, il n'existe toujours pas de modèle *in vivo* permettant d'inactiver l'inflammasome, uniquement chez la microglie. Cependant, des études *in vitro* sur des microglies primaires isolées à partir de souris IL1(R)^{-/-} et/ou de NLRP3^{-/-} pourraient aider à caractériser l'impact de ces voies et médiateurs sur le contrôle de l'EH.

En perspective, l'inhibition de l'acquisition de la réponse transcriptionnelle « *en transition* » ou bien l'élimination spécifique de ces microglies qui ont internalisé les VHS-1, sans affecter les autres classes de microglies, permettraient de mieux contrôler la réponse pro-inflammatoire, semblant être néfaste dans la phase tardive de l'EH. Pour ce faire, il serait nécessaire d'identifier et tester différentes combinaisons de marqueurs, en fonction des gènes surexprimés par les microglies « *en transition* », qui permettrait de distinguer ces dernières des cellules comme les autres microglies et les monocytes/macrophages infiltrants. Il faut ensuite continuer à caractériser ces cellules « *en transition* », pour pouvoir développer des stratégies qui nous permettront de contrôler spécifiquement ces cellules. Nous pensons

également qu'une connaissance approfondie de ces microglies faciliterait le développement de thérapies alternatives qui seraient combinées aux antiviraux.

CONCLUSION

L'EH continue d'être l'encéphalite virale sporadique mortelle la plus fréquente dans les pays industrialisés. La réponse immunitaire, indispensable pour le contrôle de la réplication virale, est de plus en plus décrite comme étant délétère dans la phase tardive de cette infection. Bien que cette dernière soit étudiée depuis près d'un siècle, notre compréhension de la pathogenèse de l'EH reste toujours limitée. Les lacunes en matière de connaissance dans la pathogenèse de l'EH, souligne la nécessité de continuer la recherche sur ce sujet.

Cette thèse a permis de générer le virus herpès simplex I recombinant neurovirulent adapté au IVIS, ce qui a permis d'identifier les régions infectées du SNC, mais également de mettre en évidence la perturbation de la BHE au cours de l'EH expérimentale. Nos travaux, portant sur l'implication inconnue de la seule cellule immunitaire résidante du SNC dans l'EH ont révélé que les microglies jouent un rôle crucial dans l'orchestration de la réponse immunitaire, ainsi que dans l'élimination du VHS-1. Le traitement des souris par le M-CSF, qui cible les microglies et les monocytes/macrophages, a amélioré le pronostic de l'EH. Nos résultats suggèrent que le nombre plus élevé de microglies ayant une activité phagocytaire plus importante chez les souris ayant reçu le M-CSF pourrait être responsable de l'amélioration du pronostic de l'EH. Par la suite, l'observation d'une mortalité plus importante, accompagnée par des titres viraux cérébraux plus élevés, en l'absence de microglie, a confirmé que ces cellules participent au contrôle de l'EH. Finalement, nous pensons qu'une meilleure compréhension de la réponse microgliale permettra de développer des stratégies d'immunomodulation qui amélioreraient le pronostic de l'EH.

Nos travaux ont également permis de révéler certains mécanismes potentiels exploités par les microglies pour contrôler cette infection. L'analyse transcriptomique des microglies isolées du noyau postéro-ventral du thalamus, identifié comme la région la plus infectée au pic de l'EH expérimentale, a montré l'activation des voies impliquées dans la dégradation des ARNm non-sens, de la phagocytose et de la présentation d'antigène. L'observation de différentes sous-populations microgliales avec différentes réponses transcriptionnelles au sein de cette même région, suggère que la réponse microgliale est dynamique et évolue au cours de l'EH. De plus, nos résultats ont révélé une sous-population microgliale, appelée « *en transition* », qui surexprime des gènes impliqués dans la production d'IL-1 β médiée par le

NLRP3-inflammasome, la signalisation de TNF et la mort cellulaire nécroptotique. Nous pensons que ces microglies acquièrent un phénotype pro-inflammatoire et contribuent à l'exacerbation de la réponse immunitaire. Alors, il serait nécessaire d'approfondir le rôle des voies de signalisation en modulant leurs expressions chez les microglies de façon spécifique, à l'aide de modèles *in vitro* et *in vivo*.

Des cellules « *microglia-like* » qui expriment certains des gènes identifiés dans nos données transcriptomiques ont été visualisées autour des zones infectées avec le VHS-1 du noyau postéro-ventral. L'analyse ultrastructurale des microglies à l'aide de la microscopie électronique a montré la présence des VHS-1 dans les endosomes. En parallèle, le manque d'activité phagocytaire, le signal VHS-1 co-localisé, et l'expression des transcrits du VHS-1 observé chez ces microglies suggèrent que ces cellules « *en transition* » pourraient être infectées avec ce virus. Il serait intéressant de confirmer la présence de l'ADN viral dans le noyau de ces cellules, ce qui aiderait à confirmer notre hypothèse.

Les zones hautement infectées du noyau postéro-ventral étaient également riches en cellules similaires aux monocytes/macrophages ayant une activité phagocytaire élevée. Malgré nos efforts d'identifier des gènes spécifiques à chaque population cellulaire, il n'existe toujours pas de marqueur spécifique permettant de distinguer les microglies des monocytes/macrophages infiltrants. Nous encourageons les prochains étudiants à identifier et à tester des différentes combinaisons potentielles de marqueurs en fonction de nos données transcriptomiques. Les expériences réalisées dans le cadre de ce projet pourraient être complétées en analysant la transcriptomique des microglies et des monocytes/macrophages isolés par cytométrie de flux à l'aide des différents fluorochromes exprimés par ces cellules dans un modèle murin chimérique.

Cette thèse suggère également que les virus sont souvent capables de contourner plusieurs mécanismes exploités par les cellules immunitaires incluant les microglies. Notre recherche a confirmé l'importance de la présence des microglies pour le contrôle de l'EH. Cependant, une des propriétés microgliales, la phagocytose, semble aider le VHS-1 se faire internaliser, ce qui est nécessaire pour une éventuelle infection de ces cellules. D'après nos résultats, l'infection microgliale déclenche l'acquisition d'un phénotype pro-inflammatoire, qui contribuerait au mauvais pronostic de l'EH. De façon générale, ces observations soulignent

que la réponse microgliale ne peut pas être catégorisée comme « bénéfique » ou « néfaste » et que leur comportement dynamique nécessite une évaluation ponctuelle de ces cellules pour chaque différente pathologie.

La réponse immunitaire cérébrale implique plusieurs acteurs immunologiques, qui n'ont pas été suffisamment abordés durant cette thèse. Il serait alors simpliste de conclure que la microglie est la seule cellule à étudier pour comprendre la réponse immunitaire innée lors de l'EH. Des futures recherches portant sur l'impact des microglies sur le fonctionnement des autres cellules immunitaires devraient être menées. Finalement, nous espérons que les résultats obtenus durant ce doctorat serviront à approfondir notre connaissance sur la réponse microgliale, ce qui permettrait un jour de mettre en place des stratégies thérapeutiques complémentaires aux antiviraux améliorant la qualité de la prise en charge des patients.

BIBLIOGRAPHIE:

1. Beswick TS. The origin and the use of the word herpes. *Med Hist.* 1962;6:214-32.
2. Roizman B, Whitley R. *Herpesviridae, Fields virology.* 6th Edition ed. Two Commerce Square, 2001 Market Street, Philadelphia, PA 19103 USA: Lippincott Williams & Wilkins; 2013.
3. Whitley RJ. Herpesviruses. In: Baron S, editors. *Medical Microbiology.* Galveston (TX)1996.
4. Davison AJ, Eberle R, Ehlers B, Hayward GS, McGeoch DJ, Minson AC, et al. The order Herpesvirales. *Arch Virol.* 2009;154(1):171-7.
5. Zamora MR. DNA viruses (CMV, EBV, and the herpesviruses). *Semin Respir Crit Care Med.* 2011;32(4):454-70.
6. Zhou L, Miranda-Saksena M, Saksena NK. Viruses and neurodegeneration. *Virol J.* 2013;10:172.
7. Petti S, Lodi G. The controversial natural history of oral herpes simplex virus type 1 infection. *Oral Dis.* 2019;25(8):1850-65.
8. Aurelian L. Herpes Simplex Viruses: General Features. In: Mahy BWJ, Van Regenmortel MHV, editors. *Encyclopedia of Virology (Third Edition).* Oxford: Academic Press; 2008. p. 383-97.
9. Riley LE. Herpes simplex virus. *Semin Perinatol.* 1998;22(4):284-92.
10. Bhatta AK, Keyal U, Liu Y, Gellen E. Vertical transmission of herpes simplex virus: an update. *J Dtsch Dermatol Ges.* 2018;16(6):685-92.
11. Sacks SL, Griffiths PD, Corey L, Cohen C, Cunningham A, Dusheiko GM, et al. HSV-2 transmission. *Antiviral Res.* 2004;63 Suppl 1:S27-35.
12. Thier K, Petermann P, Rahn E, Rothamel D, Bloch W, Knebel-Morsdorf D. Mechanical Barriers Restrict Invasion of Herpes Simplex Virus 1 into Human Oral Mucosa. *J Virol.* 2017;91(22).
13. Gershon AA, Gershon MD. Pathogenesis and current approaches to control of varicella-zoster virus infections. *Clin Microbiol Rev.* 2013;26(4):728-43.
14. Boppana SB, Fowler KB. Persistence in the population: epidemiology and transmission. In: Arvin A, Campadelli-Fiume G, Mocarski E, Moore PS, Roizman B, Whitley

R, et al., editors. Human Herpesviruses: Biology, Therapy, and Immunoprophylaxis. Cambridge2007.

15. Jarvis MA, Nelson JA. Human cytomegalovirus persistence and latency in endothelial cells and macrophages. *Curr Opin Microbiol.* 2002;5(4):403-7.

16. Emery VC, Clark DA. HHV-6A, 6B, and 7: persistence in the population, epidemiology and transmission. In: Arvin A, Campadelli-Fiume G, Mocarski E, Moore PS, Roizman B, Whitley R, et al., editors. Human Herpesviruses: Biology, Therapy, and Immunoprophylaxis. Cambridge2007.

17. Hammock L, Reisenauer A, Wang W, Cohen C, Birdsong G, Folpe AL. Latency-associated nuclear antigen expression and human herpesvirus-8 polymerase chain reaction in the evaluation of Kaposi sarcoma and other vascular tumors in HIV-positive patients. *Mod Pathol.* 2005;18(4):463-8.

18. Davison AJ. Evolution of the herpesviruses. *Vet Microbiol.* 2002;86(1-2):69-88.

19. McGeoch DJ, Rixon FJ, Davison AJ. Topics in herpesvirus genomics and evolution. *Virus Res.* 2006;117(1):90-104.

20. Alba MM, Das R, Orengo CA, Kellam P. Genomewide function conservation and phylogeny in the Herpesviridae. *Genome Res.* 2001;11(1):43-54.

21. McGeoch DJ, Cook S, Dolan A, Jamieson FE, Telford EA. Molecular phylogeny and evolutionary timescale for the family of mammalian herpesviruses. *J Mol Biol.* 1995;247(3):443-58.

22. Foulon T. [Herpesviridae: classification and structure in 1991]. *Comp Immunol Microbiol Infect Dis.* 1992;15(1):13-29.

23. White DW, Suzanne Beard R, Barton ES. Immune modulation during latent herpesvirus infection. *Immunol Rev.* 2012;245(1):189-208.

24. Kieff ED, Bachenheimer SL, Roizman B. Size, composition, and structure of the deoxyribonucleic acid of herpes simplex virus subtypes 1 and 2. *J Virol.* 1971;8(2):125-32.

25. Poffenberger KL, Roizman B. A noninverting genome of a viable herpes simplex virus 1: presence of head-to-tail linkages in packaged genomes and requirements for circularization after infection. *J Virol.* 1985;53(2):587-95.

26. Jenkins FJ, Roizman B. Herpes simplex virus 1 recombinants with noninverting genomes frozen in different isomeric arrangements are capable of independent replication. *J Virol.* 1986;59(2):494-9.
27. Knipe DM, Ruyechan WT, Honess RW, Roizman B. Molecular genetics of herpes simplex virus: the terminal a sequences of the L and S components are obligatorily identical and constitute a part of a structural gene mapping predominantly in the S component. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1979;76(9):4534-8.
28. Chou J, Roizman B. The terminal a sequence of the herpes simplex virus genome contains the promoter of a gene located in the repeat sequences of the L component. *J Virol.* 1986;57(2):629-37.
29. Haarr L, Skulstad S. The herpes simplex virus type 1 particle: structure and molecular functions. Review article. *APMIS.* 1994;102(5):321-46.
30. Rozenberg F, Deback C, Agut H. Herpes simplex encephalitis : from virus to therapy. *Infect Disord Drug Targets.* 2011;11(3):235-50.
31. Honess RW, Roizman B. Regulation of herpesvirus macromolecular synthesis. I. Cascade regulation of the synthesis of three groups of viral proteins. *J Virol.* 1974;14(1):8-19.
32. Liu F, Zhou ZH. Comparative virion structures of human herpesviruses. In: Arvin A, Campadelli-Fiume G, Mocarski E, Moore PS, Roizman B, Whitley R, et al., editors. *Human Herpesviruses: Biology, Therapy, and Immunoprophylaxis.* Cambridge 2007.
33. Muylaert I, Tang KW, Elias P. Replication and recombination of herpes simplex virus DNA. *J Biol Chem.* 2011;286(18):15619-24.
34. Boehmer PE, Lehman IR. Herpes simplex virus DNA replication. *Annu Rev Biochem.* 1997;66:347-84.
35. McGeoch DJ. The genome of herpes simplex virus: structure, replication and evolution. *J Cell Sci Suppl.* 1987;7:67-94.
36. Burton EA, Wechuck JB, Wendell SK, Goins WF, Fink DJ, Glorioso JC. Multiple applications for replication-defective herpes simplex virus vectors. *Stem Cells.* 2001;19(5):358-77.
37. Brown JC, Newcomb WW. Herpesvirus capsid assembly: insights from structural analysis. *Curr Opin Virol.* 2011;1(2):142-9.

38. Heming JD, Conway JF, Homa FL. Herpesvirus Capsid Assembly and DNA Packaging. *Adv Anat Embryol Cell Biol.* 2017;223:119-42.
39. Sciortino MT, Suzuki M, Taddeo B, Roizman B. RNAs extracted from herpes simplex virus 1 virions: apparent selectivity of viral but not cellular RNAs packaged in virions. *J Virol.* 2001;75(17):8105-16.
40. Owen DJ, Crump CM, Graham SC. Tegument Assembly and Secondary Envelopment of Alphaherpesviruses. *Viruses.* 2015;7(9):5084-114.
41. Kelly BJ, Fraefel C, Cunningham AL, Diefenbach RJ. Functional roles of the tegument proteins of herpes simplex virus type 1. *Virus Res.* 2009;145(2):173-86.
42. Reske A, Pollara G, Krummenacher C, Chain BM, Katz DR. Understanding HSV-1 entry glycoproteins. *Rev Med Virol.* 2007;17(3):205-15.
43. Baines JD. Envelopment of herpes simplex virus nucleocapsids at the inner nuclear membrane. In: Arvin A, Campadelli-Fiume G, Mocarski E, Moore PS, Roizman B, Whitley R, et al., editors. *Human Herpesviruses: Biology, Therapy, and Immunoprophylaxis.* Cambridge2007.
44. Shukla D, Spear PG. Herpesviruses and heparan sulfate: an intimate relationship in aid of viral entry. *J Clin Invest.* 2001;108(4):503-10.
45. Morgan C, Rose HM, Mednis B. Electron microscopy of herpes simplex virus. I. Entry. *J Virol.* 1968;2(5):507-16.
46. Sedy JR, Spear PG, Ware CF. Cross-regulation between herpesviruses and the TNF superfamily members. *Nat Rev Immunol.* 2008;8(11):861-73.
47. Campadelli-Fiume G, Amasio M, Avitabile E, Cerretani A, Forghieri C, Gianni T, et al. The multipartite system that mediates entry of herpes simplex virus into the cell. *Rev Med Virol.* 2007;17(5):313-26.
48. Carfi A, Willis SH, Whitbeck JC, Krummenacher C, Cohen GH, Eisenberg RJ, et al. Herpes simplex virus glycoprotein D bound to the human receptor HveA. *Mol Cell.* 2001;8(1):169-79.
49. Akhtar J, Shukla D. Viral entry mechanisms: cellular and viral mediators of herpes simplex virus entry. *FEBS J.* 2009;276(24):7228-36.

50. Ojala PM, Sodeik B, Ebersold MW, Kutay U, Helenius A. Herpes simplex virus type 1 entry into host cells: reconstitution of capsid binding and uncoating at the nuclear pore complex in vitro. *Mol Cell Biol.* 2000;20(13):4922-31.
51. Dohner K, Wolfstein A, Prank U, Echeverri C, Dujardin D, Vallee R, et al. Function of dynein and dynactin in herpes simplex virus capsid transport. *Mol Biol Cell.* 2002;13(8):2795-809.
52. Sodeik B, Ebersold MW, Helenius A. Microtubule-mediated transport of incoming herpes simplex virus 1 capsids to the nucleus. *J Cell Biol.* 1997;136(5):1007-21.
53. Fay N, Pante N. Nuclear entry of DNA viruses. *Front Microbiol.* 2015;6:467.
54. Morrison EE, Wang YF, Meredith DM. Phosphorylation of structural components promotes dissociation of the herpes simplex virus type 1 tegument. *J Virol.* 1998;72(9):7108-14.
55. Rajcani J, Andrea V, Ingeborg R. Peculiarities of herpes simplex virus (HSV) transcription: an overview. *Virus Genes.* 2004;28(3):293-310.
56. Weir JP. Regulation of herpes simplex virus gene expression. *Gene.* 2001;271(2):117-30.
57. Alandijany T. Host Intrinsic and Innate Intracellular Immunity During Herpes Simplex Virus Type 1 (HSV-1) Infection. *Front Microbiol.* 2019;10:2611.
58. Taylor TJ, Brockman MA, McNamee EE, Knipe DM. Herpes simplex virus. *Front Biosci.* 2002;7:d752-64.
59. Weller SK, Coen DM. Herpes simplex viruses: mechanisms of DNA replication. *Cold Spring Harb Perspect Biol.* 2012;4(9):a013011.
60. Zarrouk K, Piret J, Boivin G. Herpesvirus DNA polymerases: Structures, functions and inhibitors. *Virus Res.* 2017;234:177-92.
61. Matthews JT, Terry BJ, Field AK. The structure and function of the HSV DNA replication proteins: defining novel antiviral targets. *Antiviral Res.* 1993;20(2):89-114.
62. Wills E, Scholtes L, Baines JD. Herpes simplex virus 1 DNA packaging proteins encoded by UL6, UL15, UL17, UL28, and UL33 are located on the external surface of the viral capsid. *J Virol.* 2006;80(21):10894-9.
63. Tandon R, Mocarski ES, Conway JF. The A, B, Cs of herpesvirus capsids. *Viruses.* 2015;7(3):899-914.

64. Church GA, Wilson DW. Study of herpes simplex virus maturation during a synchronous wave of assembly. *J Virol.* 1997;71(5):3603-12.
65. Sheaffer AK, Newcomb WW, Gao M, Yu D, Weller SK, Brown JC, et al. Herpes simplex virus DNA cleavage and packaging proteins associate with the procapsid prior to its maturation. *J Virol.* 2001;75(2):687-98.
66. Newcomb WW, Thomsen DR, Homa FL, Brown JC. Assembly of the herpes simplex virus capsid: identification of soluble scaffold-portal complexes and their role in formation of portal-containing capsids. *J Virol.* 2003;77(18):9862-71.
67. Crump C. Virus Assembly and Egress of HSV. *Adv Exp Med Biol.* 2018;1045:23-44.
68. Mettenleiter TC. Herpesvirus assembly and egress. *J Virol.* 2002;76(4):1537-47.
69. Knipe DM, Howley PM. *Fields virology.* 6th ed. Philadelphia, PA: Wolters Kluwer/Lippincott Williams & Wilkins Health; 2013. 2 volumes p.
70. Lv Y, Zhou S, Gao S, Deng H. Remodeling of host membranes during herpesvirus assembly and egress. *Protein Cell.* 2019;10(5):315-26.
71. Cunningham AL, Diefenbach RJ, Miranda-Saksena M, Bosnjak L, Kim M, Jones C, et al. The cycle of human herpes simplex virus infection: virus transport and immune control. *J Infect Dis.* 2006;194 Suppl 1:S11-8.
72. Kukhanova MK, Korovina AN, Kochetkov SN. Human herpes simplex virus: life cycle and development of inhibitors. *Biochemistry (Mosc).* 2014;79(13):1635-52.
73. Toma HS, Murina AT, Areaux RG, Jr., Neumann DM, Bhattacharjee PS, Foster TP, et al. Ocular HSV-1 latency, reactivation and recurrent disease. *Semin Ophthalmol.* 2008;23(4):249-73.
74. Preston CM, Efstathiou S. Molecular basis of HSV latency and reactivation. In: Arvin A, Campadelli-Fiume G, Mocarski E, Moore PS, Roizman B, Whitley R, et al., editors. *Human Herpesviruses: Biology, Therapy, and Immunoprophylaxis.* Cambridge 2007.
75. Knipe DM, Cliffe A. Chromatin control of herpes simplex virus lytic and latent infection. *Nat Rev Microbiol.* 2008;6(3):211-21.
76. Perng GC, Jones C, Ciacci-Zanella J, Stone M, Henderson G, Yukht A, et al. Virus-induced neuronal apoptosis blocked by the herpes simplex virus latency-associated transcript. *Science.* 2000;287(5457):1500-3.

77. Nicoll MP, Proenca JT, Efstathiou S. The molecular basis of herpes simplex virus latency. *FEMS Microbiol Rev.* 2012;36(3):684-705.
78. Pyles RB, Sawtell NM, Thompson RL. Herpes simplex virus type 1 dUTPase mutants are attenuated for neurovirulence, neuroinvasiveness, and reactivation from latency. *J Virol.* 1992;66(11):6706-13.
79. Huffmaster NJ, Sollars PJ, Richards AL, Pickard GE, Smith GA. Dynamic ubiquitination drives herpesvirus neuroinvasion. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2015;112(41):12818-23.
80. Richards AL, Sollars PJ, Pitts JD, Stults AM, Heldwein EE, Pickard GE, et al. The pUL37 tegument protein guides alpha-herpesvirus retrograde axonal transport to promote neuroinvasion. *PLoS Pathog.* 2017;13(12):e1006741.
81. 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. *J Virol.* 2012;86(9):5264-77.
82. Chou J, Kern ER, Whitley RJ, Roizman B. Mapping of herpes simplex virus-1 neurovirulence to gamma 134.5, a gene nonessential for growth in culture. *Science.* 1990;250(4985):1262-6.
83. Whitley RJ, Kern ER, Chatterjee S, Chou J, Roizman B. Replication, establishment of latency, and induced reactivation of herpes simplex virus gamma 1 34.5 deletion mutants in rodent models. *J Clin Invest.* 1993;91(6):2837-43.
84. Wilcox DR, Longnecker R. The Herpes Simplex Virus Neurovirulence Factor gamma34.5: Revealing Virus-Host Interactions. *PLoS Pathog.* 2016;12(3):e1005449.
85. Whitley R, Kimberlin DW, Prober CG. Pathogenesis and disease. In: Arvin A, Campadelli-Fiume G, Mocarski E, Moore PS, Roizman B, Whitley R, et al., editors. *Human Herpesviruses: Biology, Therapy, and Immunoprophylaxis.* Cambridge2007.
86. Madavaraju K, Koganti R, Volety I, Yadavalli T, Shukla D. Herpes Simplex Virus Cell Entry Mechanisms: An Update. *Front Cell Infect Microbiol.* 2020;10:617578.
87. Yamamoto Y, Yamamoto T, Aoyama Y, Fujimoto W. Cell-to-cell transmission of HSV-1 in differentiated keratinocytes promotes multinucleated giant cell formation. *J Dermatol Sci.* 2019;93(1):14-23.

88. Whitley RJ, Roizman B. Herpes simplex virus infections. *Lancet*. 2001;357(9267):1513-8.
89. Obara Y, Furuta Y, Takasu T, Suzuki S, Suzuki H, Matsukawa S, et al. Distribution of herpes simplex virus types 1 and 2 genomes in human spinal ganglia studied by PCR and in situ hybridization. *J Med Virol*. 1997;52(2):136-42.
90. Ohana B, Lipson M, Vered N, Srugo I, Ahdut M, Morag A. Novel approach for specific detection of herpes simplex virus type 1 and 2 antibodies and immunoglobulin G and M antibodies. *Clin Diagn Lab Immunol*. 2000;7(6):904-8.
91. Liesegang TJ. Herpes simplex virus epidemiology and ocular importance. *Cornea*. 2001;20(1):1-13.
92. Whitley RJ, Kimberlin DW, Roizman B. Herpes simplex viruses. *Clin Infect Dis*. 1998;26(3):541-53; quiz 54-5.
93. Black FL, Hierholzer WJ, Pinheiro F, Evans AS, Woodall JP, Opton EM, et al. Evidence for persistence of infectious agents in isolated human populations. *Am J Epidemiol*. 1974;100(3):230-50.
94. Fanfair RN, Zaidi A, Taylor LD, Xu F, Gottlieb S, Markowitz L. Trends in seroprevalence of herpes simplex virus type 2 among non-Hispanic blacks and non-Hispanic whites aged 14 to 49 years--United States, 1988 to 2010. *Sex Transm Dis*. 2013;40(11):860-4.
95. Brown ZA, Selke S, Zeh J, Kopelman J, Maslow A, Ashley RL, et al. The acquisition of herpes simplex virus during pregnancy. *N Engl J Med*. 1997;337(8):509-15.
96. Rawls WE, Hammerberg O. Epidemiology of the herpes simplex viruses. *Clin Dermatol*. 1984;2(2):29-45.
97. Wishart MS, Darougar S, Viswalingam ND. Recurrent herpes simplex virus ocular infection: epidemiological and clinical features. *Br J Ophthalmol*. 1987;71(9):669-72.
98. Fatahzadeh M, Schwartz RA. Human herpes simplex virus infections: epidemiology, pathogenesis, symptomatology, diagnosis, and management. *J Am Acad Dermatol*. 2007;57(5):737-63; quiz 64-6.
99. Tyler KL. Herpes simplex virus infections of the central nervous system: encephalitis and meningitis, including Mollaret's. *Herpes*. 2004;11 Suppl 2:57A-64A.

100. Hjalmarsson A, Blomqvist P, Skoldenberg B. Herpes simplex encephalitis in Sweden, 1990-2001: incidence, morbidity, and mortality. *Clin Infect Dis*. 2007;45(7):875-80.
101. Venkatesan A. Epidemiology and outcomes of acute encephalitis. *Curr Opin Neurol*. 2015;28(3):277-82.
102. Jouan Y, Grammatico-Guillon L, Espitalier F, Cazals X, Francois P, Guillon A. Long-term outcome of severe herpes simplex encephalitis: a population-based observational study. *Crit Care*. 2015;19:345.
103. Raschilas F, Wolff M, Delatour F, Chaffaut C, De Broucker T, Chevret S, et al. Outcome of and prognostic factors for herpes simplex encephalitis in adult patients: results of a multicenter study. *Clin Infect Dis*. 2002;35(3):254-60.
104. Kennedy PG, Chaudhuri A. Herpes simplex encephalitis. *J Neurol Neurosurg Psychiatry*. 2002;73(3):237-8.
105. Arduino PG, Porter SR. Herpes Simplex Virus Type 1 infection: overview on relevant clinico-pathological features. *J Oral Pathol Med*. 2008;37(2):107-21.
106. Fatahzadeh M, Schwartz RA. Human herpes simplex labialis. *Clin Exp Dermatol*. 2007;32(6):625-30.
107. Aslanova M, Zito PM. Herpetic Gingivostomatitis. *StatPearls*. Treasure Island (FL)2020.
108. Simmons A. Clinical manifestations and treatment considerations of herpes simplex virus infection. *J Infect Dis*. 2002;186 Suppl 1:S71-7.
109. Kolokotronis A, Doumas S. Herpes simplex virus infection, with particular reference to the progression and complications of primary herpetic gingivostomatitis. *Clin Microbiol Infect*. 2006;12(3):202-11.
110. Corey L, Adams HG, Brown ZA, Holmes KK. Genital herpes simplex virus infections: clinical manifestations, course, and complications. *Ann Intern Med*. 1983;98(6):958-72.
111. Reeves WC, Corey L, Adams HG, Vontver LA, Holmes KK. Risk of recurrence after first episodes of genital herpes. Relation to HSV type and antibody response. *N Engl J Med*. 1981;305(6):315-9.
112. Wald A, Zeh J, Selke S, Ashley RL, Corey L. Virologic characteristics of subclinical and symptomatic genital herpes infections. *N Engl J Med*. 1995;333(12):770-5.

113. Nahmias AJ, Josey WE, Naib ZM, Freeman MG, Fernandez RJ, Wheeler JH. Perinatal risk associated with maternal genital herpes simplex virus infection. *Am J Obstet Gynecol.* 1971;110(6):825-37.
114. Jacobs RF. Neonatal herpes simplex virus infections. *Semin Perinatol.* 1998;22(1):64-71.
115. Whitley R, Arvin A, Prober C, Corey L, Burchett S, Plotkin S, et al. Predictors of morbidity and mortality in neonates with herpes simplex virus infections. The National Institute of Allergy and Infectious Diseases Collaborative Antiviral Study Group. *N Engl J Med.* 1991;324(7):450-4.
116. Darougar S, Wishart MS, Viswalingam ND. Epidemiological and clinical features of primary herpes simplex virus ocular infection. *Br J Ophthalmol.* 1985;69(1):2-6.
117. Lobo AM, Agelidis AM, Shukla D. Pathogenesis of herpes simplex keratitis: The host cell response and ocular surface sequelae to infection and inflammation. *Ocul Surf.* 2019;17(1):40-9.
118. Binder PS. Herpes simplex keratitis. *Surv Ophthalmol.* 1977;21(4):313-31.
119. Dinotta F, De Pasquale R, Nasca MR, Tedeschi A, Micali G. Disseminated herpes simplex infection in a HIV+ patient. *G Ital Dermatol Venereol.* 2009;144(2):205-9.
120. 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? *Can J Infect Dis Med Microbiol.* 2009;20(1):e1-7.
121. Freeman EE, Weiss HA, Glynn JR, Cross PL, Whitworth JA, Hayes RJ. Herpes simplex virus 2 infection increases HIV acquisition in men and women: systematic review and meta-analysis of longitudinal studies. *AIDS.* 2006;20(1):73-83.
122. Pereira FA. Herpes simplex: evolving concepts. *J Am Acad Dermatol.* 1996;35(4):503-20; quiz 21-2.
123. Nahmias AJ, Roizman B. Infection with herpes-simplex viruses 1 and 2. 1. *N Engl J Med.* 1973;289(13):667-74.
124. Kriebs JM. Understanding herpes simplex virus: transmission, diagnosis, and considerations in pregnancy management. *J Midwifery Womens Health.* 2008;53(3):202-8.
125. Wald A, Ashley-Morrow R. Serological testing for herpes simplex virus (HSV)-1 and HSV-2 infection. *Clin Infect Dis.* 2002;35(Suppl 2):S173-82.

126. Ogilvie M. Molecular techniques should not now replace cell culture in diagnostic virology laboratories. *Rev Med Virol.* 2001;11(6):351-4.
127. Lafferty WE, Krofft S, Remington M, Giddings R, Winter C, Cent A, et al. Diagnosis of herpes simplex virus by direct immunofluorescence and viral isolation from samples of external genital lesions in a high-prevalence population. *J Clin Microbiol.* 1987;25(2):323-6.
128. Aurelius E, Johansson B, Skoldenberg B, Staland A, Forsgren M. Rapid diagnosis of herpes simplex encephalitis by nested polymerase chain reaction assay of cerebrospinal fluid. *Lancet.* 1991;337(8735):189-92.
129. Revello MG, Baldanti F, Sarasini A, Zella D, Zavattoni M, Gerna G. Quantitation of herpes simplex virus DNA in cerebrospinal fluid of patients with herpes simplex encephalitis by the polymerase chain reaction. *Clin Diagn Virol.* 1997;7(3):183-91.
130. Kimura H, Futamura M, Kito H, Ando T, Goto M, Kuzushima K, et al. Detection of viral DNA in neonatal herpes simplex virus infections: frequent and prolonged presence in serum and cerebrospinal fluid. *J Infect Dis.* 1991;164(2):289-93.
131. Reiss CS. *Neurotropic viral infections.* Cambridge, UK ; New York: Cambridge University Press; 2008. xvi, 455 p., 12 p. of plates p.
132. Bradshaw MJ, Venkatesan A. Herpes Simplex Virus-1 Encephalitis in Adults: Pathophysiology, Diagnosis, and Management. *Neurotherapeutics.* 2016;13(3):493-508.
133. Jennische E, Eriksson CE, Lange S, Trybala E, Bergstrom T. The anterior commissure is a pathway for contralateral spread of herpes simplex virus type 1 after olfactory tract infection. *J Neurovirol.* 2015;21(2):129-47.
134. Bello-Morales R, Andreu S, Lopez-Guerrero JA. The Role of Herpes Simplex Virus Type 1 Infection in Demyelination of the Central Nervous System. *Int J Mol Sci.* 2020;21(14).
135. Sobel RA, Collins AB, Colvin RB, Bhan AK. The in situ cellular immune response in acute herpes simplex encephalitis. *Am J Pathol.* 1986;125(2):332-8.
136. Sili U, Kaya A, Mert A, Group HSVES. Herpes simplex virus encephalitis: clinical manifestations, diagnosis and outcome in 106 adult patients. *J Clin Virol.* 2014;60(2):112-8.
137. Lakeman FD, Whitley RJ. Diagnosis of herpes simplex encephalitis: application of polymerase chain reaction to cerebrospinal fluid from brain-biopsied patients and correlation

with disease. National Institute of Allergy and Infectious Diseases Collaborative Antiviral Study Group. *J Infect Dis.* 1995;171(4):857-63.

138. Ramos-Estebanez C, Lizarraga KJ, Merenda A. A systematic review on the role of adjunctive corticosteroids in herpes simplex virus encephalitis: is timing critical for safety and efficacy? *Antivir Ther.* 2014;19(2):133-9.

139. McCabe K, Tyler K, Tanabe J. Diffusion-weighted MRI abnormalities as a clue to the diagnosis of herpes simplex encephalitis. *Neurology.* 2003;61(7):1015-6.

140. Kumar R. Understanding and managing acute encephalitis. *F1000Res.* 2020;9.

141. Algahtani H, Shirah B, Hmoud M, Subahi A. Nosocomial herpes simplex encephalitis: A challenging diagnosis. *J Infect Public Health.* 2017;10(3):343-7.

142. Kleymann G. Novel agents and strategies to treat herpes simplex virus infections. *Expert Opin Investig Drugs.* 2003;12(2):165-83.

143. Jiang YC, Feng H, Lin YC, Guo XR. New strategies against drug resistance to herpes simplex virus. *Int J Oral Sci.* 2016;8(1):1-6.

144. Das D, Hong J. Chapter 12 - Herpesvirus Polymerase Inhibitors. In: Gupta SP, editor. *Viral Polymerases: Academic Press; 2019.* p. 333-56.

145. Piret J, Boivin G. Antiviral resistance in herpes simplex virus and varicella-zoster virus infections: diagnosis and management. *Curr Opin Infect Dis.* 2016;29(6):654-62.

146. Piret J, Boivin G. Antiviral drug resistance in herpesviruses other than cytomegalovirus. *Rev Med Virol.* 2014;24(3):186-218.

147. Lycke J, Malmstrom C, Stahle L. Acyclovir levels in serum and cerebrospinal fluid after oral administration of valacyclovir. *Antimicrob Agents Chemother.* 2003;47(8):2438-41.

148. Takeda M, Khamdang S, Narikawa S, Kimura H, Kobayashi Y, Yamamoto T, et al. Human organic anion transporters and human organic cation transporters mediate renal antiviral transport. *J Pharmacol Exp Ther.* 2002;300(3):918-24.

149. Stahl JP, Mailles A, De Broucker T, Steering C, Investigators G. Herpes simplex encephalitis and management of acyclovir in encephalitis patients in France. *Epidemiol Infect.* 2012;140(2):372-81.

150. De Tiege X, Rozenberg F, Des Portes V, Lobut JB, Lebon P, Ponsot G, et al. Herpes simplex encephalitis relapses in children: differentiation of two neurologic entities. *Neurology*. 2003;61(2):241-3.
151. Mohammad SS, Sinclair K, Pillai S, Merheb V, Aumann TD, Gill D, et al. Herpes simplex encephalitis relapse with chorea is associated with autoantibodies to N-Methyl-D-aspartate receptor or dopamine-2 receptor. *Mov Disord*. 2014;29(1):117-22.
152. Nosadini M, Eyre M, Molteni E, Thomas T, Irani SR, Dalmau J, et al. Use and Safety of Immunotherapeutic Management of N-Methyl-d-Aspartate Receptor Antibody Encephalitis: A Meta-analysis. *JAMA Neurol*. 2021;78(11):1333-44.
153. Bradford RD, Pettit AC, Wright PW, Mulligan MJ, Moreland LW, McLain DA, et al. Herpes simplex encephalitis during treatment with tumor necrosis factor-alpha inhibitors. *Clin Infect Dis*. 2009;49(6):924-7.
154. Piret J, Boivin G. Innate immune response during herpes simplex virus encephalitis and development of immunomodulatory strategies. *Rev Med Virol*. 2015;25(5):300-19.
155. Mesker AJ, Bon GG, de Gans J, de Kruijk JR. Case report: a pregnant woman with herpes simplex encephalitis successfully treated with dexamethasone. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol*. 2011;154(2):231-2.
156. Yamamoto K, Chiba HO, Ishitobi M, Nakagawa H, Ogawa T, Ishii K. Acute encephalopathy with bilateral striatal necrosis: favourable response to corticosteroid therapy. *Eur J Paediatr Neurol*. 1997;1(1):41-5.
157. Musallam B, Matoth I, Wolf DG, Engelhard D, Averbuch D. Steroids for deteriorating herpes simplex virus encephalitis. *Pediatr Neurol*. 2007;37(3):229-32.
158. Kamei S, Taira N, Ishihara M, Sekizawa T, Morita A, Miki K, et al. Prognostic value of cerebrospinal fluid cytokine changes in herpes simplex virus encephalitis. *Cytokine*. 2009;46(2):187-93.
159. Piret J, Boivin G. Immunomodulatory Strategies in Herpes Simplex Virus Encephalitis. *Clin Microbiol Rev*. 2020;33(2).
160. 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. *J Infect Dis*. 2007;195(6):817-25.

161. Roberts CM, Pfister JR, Spear SJ. Increasing proportion of herpes simplex virus type 1 as a cause of genital herpes infection in college students. *Sex Transm Dis.* 2003;30(10):797-800.
162. Looker KJ, Magaret AS, Turner KM, Vickerman P, Gottlieb SL, Newman LM. Global estimates of prevalent and incident herpes simplex virus type 2 infections in 2012. *PLoS One.* 2015;10(1):e114989.
163. Varela FH, Pinto LA, Scotta MC. Global impact of varicella vaccination programs. *Hum Vaccin Immunother.* 2019;15(3):645-57.
164. Aschner CB, Herold BC. Alphaherpesvirus Vaccines. *Curr Issues Mol Biol.* 2021;41:469-508.
165. Takahashi M, Otsuka T, Okuno Y, Asano Y, Yazaki T. Live vaccine used to prevent the spread of varicella in children in hospital. *Lancet.* 1974;2(7892):1288-90.
166. Lal H, Cunningham AL, Godeaux O, Chlibek R, Diez-Domingo J, Hwang SJ, et al. Efficacy of an adjuvanted herpes zoster subunit vaccine in older adults. *N Engl J Med.* 2015;372(22):2087-96.
167. Cunningham AL, Lal H, Kovac M, Chlibek R, Hwang SJ, Diez-Domingo J, et al. Efficacy of the Herpes Zoster Subunit Vaccine in Adults 70 Years of Age or Older. *N Engl J Med.* 2016;375(11):1019-32.
168. Corey L, Langenberg AG, Ashley R, Sekulovich RE, Izu AE, Douglas JM, Jr., et al. Recombinant glycoprotein vaccine for the prevention of genital HSV-2 infection: two randomized controlled trials. Chiron HSV Vaccine Study Group. *JAMA.* 1999;282(4):331-40.
169. Stanberry LR, Spruance SL, Cunningham AL, Bernstein DI, Mindel A, Sacks S, et al. Glycoprotein-D-adjuvant vaccine to prevent genital herpes. *N Engl J Med.* 2002;347(21):1652-61.
170. Orr MT, Edelmann KH, Vieira J, Corey L, Raulet DH, Wilson CB. Inhibition of MHC class I is a virulence factor in herpes simplex virus infection of mice. *PLoS Pathog.* 2005;1(1):e7.
171. Chew T, Taylor KE, Mossman KL. Innate and adaptive immune responses to herpes simplex virus. *Viruses.* 2009;1(3):979-1002.

172. Sattentau Q. Avoiding the void: cell-to-cell spread of human viruses. *Nat Rev Microbiol.* 2008;6(11):815-26.
173. Dubin G, Socolof E, Frank I, Friedman HM. Herpes simplex virus type 1 Fc receptor protects infected cells from antibody-dependent cellular cytotoxicity. *J Virol.* 1991;65(12):7046-50.
174. McNearney TA, Odell C, Holers VM, Spear PG, Atkinson JP. Herpes simplex virus glycoproteins gC-1 and gC-2 bind to the third component of complement and provide protection against complement-mediated neutralization of viral infectivity. *J Exp Med.* 1987;166(5):1525-35.
175. Awasthi S, Hook LM, Pardi N, Wang F, Myles A, Cancro MP, et al. Nucleoside-modified mRNA encoding HSV-2 glycoproteins C, D, and E prevents clinical and subclinical genital herpes. *Sci Immunol.* 2019;4(39).
176. Liao Y, Bajwa K, Reddy SM, Lupiani B. Methods for the Manipulation of Herpesvirus Genome and the Application to Marek's Disease Virus Research. *Microorganisms.* 2021;9(6).
177. Zhang I, Hsiao Z, Liu F. Development of Genome Editing Approaches against Herpes Simplex Virus Infections. *Viruses.* 2021;13(2).
178. Schaffer P, Vonka V, Lewis R, Benyesh-Melnick M. Temperature-sensitive mutants of herpes simplex virus. *Virology.* 1970;42(4):1144-6.
179. Schroder CH, Kumel G, Glorioso J, Kirchner H, Kaerner HC. Neuropathogenicity of herpes simplex virus in mice: protection against lethal encephalitis by co-infection with a non-encephalitogenic strain. *J Gen Virol.* 1983;64 (Pt 9):1973-82.
180. Post LE, Roizman B. A generalized technique for deletion of specific genes in large genomes: alpha gene 22 of herpes simplex virus 1 is not essential for growth. *Cell.* 1981;25(1):227-32.
181. Smiley JR. Construction in vitro and rescue of a thymidine kinase-deficient deletion mutation of herpes simplex virus. *Nature.* 1980;285(5763):333-5.
182. Kakiuchi S, Nonoyama S, Wakamatsu H, Kogawa K, Wang L, Kinoshita-Yamaguchi H, et al. Neonatal herpes encephalitis caused by a virologically confirmed acyclovir-resistant herpes simplex virus 1 strain. *J Clin Microbiol.* 2013;51(1):356-9.

183. Collins J, Hohn B. Cosmids: a type of plasmid gene-cloning vector that is packageable in vitro in bacteriophage lambda heads. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1978;75(9):4242-6.
184. Cunningham C, Davison AJ. A cosmid-based system for constructing mutants of herpes simplex virus type 1. *Virology.* 1993;197(1):116-24.
185. Leopardi R, Van Sant C, Roizman B. The herpes simplex virus 1 protein kinase US3 is required for protection from apoptosis induced by the virus. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1997;94(15):7891-6.
186. Shizuya H, Birren B, Kim UJ, Mancino V, Slepak T, Tachiiri Y, et al. Cloning and stable maintenance of 300-kilobase-pair fragments of human DNA in *Escherichia coli* using an F-factor-based vector. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1992;89(18):8794-7.
187. Messerle M, Crnkovic I, Hammerschmidt W, Ziegler H, Koszinowski UH. Cloning and mutagenesis of a herpesvirus genome as an infectious bacterial artificial chromosome. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1997;94(26):14759-63.
188. Tischer BK, Smith GA, Osterrieder N. En passant mutagenesis: a two step markerless red recombination system. *Methods Mol Biol.* 2010;634:421-30.
189. Bodda C, Reinert LS, Fruhwurth S, Richardo T, Sun C, Zhang BC, et al. HSV1 VP1-2 deubiquitinates STING to block type I interferon expression and promote brain infection. *J Exp Med.* 2020;217(7).
190. Spatz SJ, Zhao Y, Petherbridge L, Smith LP, Baigent SJ, Nair V. Comparative sequence analysis of a highly oncogenic but horizontal spread-defective clone of Marek's disease virus. *Virus Genes.* 2007;35(3):753-66.
191. Bi Y, Sun L, Gao D, Ding C, Li Z, Li Y, et al. High-efficiency targeted editing of large viral genomes by RNA-guided nucleases. *PLoS Pathog.* 2014;10(5):e1004090.
192. Ebrahimi S, Teimoori A, Khanbabaie H, Tabasi M. Harnessing CRISPR/Cas 9 System for manipulation of DNA virus genome. *Rev Med Virol.* 2019;29(1):e2009.
193. Yin D, Ling S, Wang D, Dai Y, Jiang H, Zhou X, et al. Targeting herpes simplex virus with CRISPR-Cas9 cures herpetic stromal keratitis in mice. *Nat Biotechnol.* 2021;39(5):567-77.

194. Oh HS, Neuhausser WM, Eggan P, Angelova M, Kirchner R, Eggan KC, et al. Herpesviral lytic gene functions render the viral genome susceptible to novel editing by CRISPR/Cas9. *Elife*. 2019;8.
195. van Diemen FR, Lebbink RJ. CRISPR/Cas9, a powerful tool to target human herpesviruses. *Cell Microbiol*. 2017;19(2).
196. Banks WA. The blood-brain barrier in neuroimmunology: Tales of separation and assimilation. *Brain Behav Immun*. 2015;44:1-8.
197. Xu L, Nirwane A, Yao Y. Basement membrane and blood-brain barrier. *Stroke Vasc Neurol*. 2019;4(2):78-82.
198. Chapouly C, Tadesse Argaw A, Horng S, Castro K, Zhang J, Asp L, et al. Astrocytic TYMP and VEGFA drive blood-brain barrier opening in inflammatory central nervous system lesions. *Brain*. 2015;138(Pt 6):1548-67.
199. Armulik A, Genove G, Mae M, Nisancioglu MH, Wallgard E, Niaudet C, et al. Pericytes regulate the blood-brain barrier. *Nature*. 2010;468(7323):557-61.
200. Brankin B, Hart MN, Cosby SL, Fabry Z, Allen IV. Adhesion molecule expression and lymphocyte adhesion to cerebral endothelium: effects of measles virus and herpes simplex 1 virus. *J Neuroimmunol*. 1995;56(1):1-8.
201. Rahman A, Anwar KN, Malik AB. Protein kinase C-zeta mediates TNF-alpha-induced ICAM-1 gene transcription in endothelial cells. *Am J Physiol Cell Physiol*. 2000;279(4):C906-14.
202. Wong D, Dorovini-Zis K, Vincent SR. Cytokines, nitric oxide, and cGMP modulate the permeability of an in vitro model of the human blood-brain barrier. *Exp Neurol*. 2004;190(2):446-55.
203. Kolb SA, Lahrtz F, Paul R, Leppert D, Nadal D, Pfister HW, et al. Matrix metalloproteinases and tissue inhibitors of metalloproteinases in viral meningitis: upregulation of MMP-9 and TIMP-1 in cerebrospinal fluid. *J Neuroimmunol*. 1998;84(2):143-50.
204. Zhou Y, Lu ZN, Guo YJ, Mei YW. Favorable effects of MMP-9 knockdown in murine herpes simplex encephalitis using small interfering RNA. *Neurol Res*. 2010;32(8):801-9.

205. 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.
206. Shayakhmetov DM, Di Paolo NC, Mossman KL. Recognition of virus infection and innate host responses to viral gene therapy vectors. *Mol Ther*. 2010;18(8):1422-9.
207. Paludan SR, Bowie AG, Horan KA, Fitzgerald KA. Recognition of herpesviruses by the innate immune system. *Nat Rev Immunol*. 2011;11(2):143-54.
208. Zheng W, Xu Q, Zhang Y, E X, Gao W, Zhang M, et al. Correction to: Toll-like receptor-mediated innate immunity against herpesviridae infection: a current perspective on viral infection signaling pathways. *Virology*. 2020;17(1):199.
209. Mukherjee S, Karmakar S, Babu SP. TLR2 and TLR4 mediated host immune responses in major infectious diseases: a review. *Braz J Infect Dis*. 2016;20(2):193-204.
210. Haas T, Metzger J, Schmitz F, Heit A, Muller T, Latz E, et al. The DNA sugar backbone 2' deoxyribose determines toll-like receptor 9 activation. *Immunity*. 2008;28(3):315-23.
211. 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.
212. Jacobs BL, Langland JO. When two strands are better than one: the mediators and modulators of the cellular responses to double-stranded RNA. *Virology*. 1996;219(2):339-49.
213. 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.
214. 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.
215. 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. *J Virol*. 2007;81(24):13315-24.
216. 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.

217. 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. *J Virol.* 2010;84(21):11350-8.
218. Maillard PV, Ciaudo C, Marchais A, Li Y, Jay F, Ding SW, et al. Antiviral RNA interference in mammalian cells. *Science.* 2013;342(6155):235-8.
219. van der Veen AG, Maillard PV, Schmidt JM, Lee SA, Deddouche-Grass S, Borg A, et al. The RIG-I-like receptor LGP2 inhibits Dicer-dependent processing of long double-stranded RNA and blocks RNA interference in mammalian cells. *EMBO J.* 2018;37(4).
220. Satoh T, Kato H, Kumagai Y, Yoneyama M, Sato S, Matsushita K, et al. LGP2 is a positive regulator of RIG-I- and MDA5-mediated antiviral responses. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2010;107(4):1512-7.
221. Zheng C. The emerging roles of NOD-like receptors in antiviral innate immune signaling pathways. *Int J Biol Macromol.* 2021;169:407-13.
222. Walsh JG, Muruve DA, Power C. Inflammasomes in the CNS. *Nat Rev Neurosci.* 2014;15(2):84-97.
223. Gimenez F, Bhela S, Dogra P, Harvey L, Varanasi SK, Jaggi U, et al. The inflammasome NLRP3 plays a protective role against a viral immunopathological lesion. *J Leukoc Biol.* 2016;99(5):647-57.
224. Johnson KE, Chikoti L, Chandran B. Herpes simplex virus 1 infection induces activation and subsequent inhibition of the IFI16 and NLRP3 inflammasomes. *J Virol.* 2013;87(9):5005-18.
225. Zhang L, Mo J, Swanson KV, Wen H, Petrucelli A, Gregory SM, et al. NLRC3, a member of the NLR family of proteins, is a negative regulator of innate immune signaling induced by the DNA sensor STING. *Immunity.* 2014;40(3):329-41.
226. Diner BA, Lum KK, Cristea IM. The emerging role of nuclear viral DNA sensors. *J Biol Chem.* 2015;290(44):26412-21.
227. 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.

228. 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.
229. Reinert LS, Lopusna K, Winther H, Sun C, Thomsen MK, Nandakumar R, et al. Sensing of HSV-1 by the cGAS-STING pathway in microglia orchestrates antiviral defence in the CNS. *Nat Commun*. 2016;7:13348.
230. Komatsu T, Nagata K, Wodrich H. The Role of Nuclear Antiviral Factors against Invading DNA Viruses: The Immediate Fate of Incoming Viral Genomes. *Viruses*. 2016;8(10).
231. 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.
232. Audry M, Ciancanelli M, Yang K, Cobat A, Chang HH, Sancho-Shimizu V, et al. NEMO is a key component of NF-kappaB- and IRF-3-dependent TLR3-mediated immunity to herpes simplex virus. *J Allergy Clin Immunol*. 2011;128(3):610-7 e1-4.
233. Menachery VD, Pasioka TJ, Leib DA. Interferon regulatory factor 3-dependent pathways are critical for control of herpes simplex virus type 1 central nervous system infection. *J Virol*. 2010;84(19):9685-94.
234. 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.
235. Moens U, Kostenko S, Sveinbjornsson B. The Role of Mitogen-Activated Protein Kinase-Activated Protein Kinases (MAPKAPKs) in Inflammation. *Genes (Basel)*. 2013;4(2):101-33.
236. Jang KL, Pulverer B, Woodgett JR, Latchman DS. Activation of the cellular transcription factor AP-1 in herpes simplex virus infected cells is dependent on the viral immediate-early protein ICPO. *Nucleic Acids Res*. 1991;19(18):4879-83.
237. Zachos G, Clements B, Conner J. Herpes simplex virus type 1 infection stimulates p38/c-Jun N-terminal mitogen-activated protein kinase pathways and activates transcription factor AP-1. *J Biol Chem*. 1999;274(8):5097-103.
238. Mancini M, Vidal SM. Insights into the pathogenesis of herpes simplex encephalitis from mouse models. *Mamm Genome*. 2018;29(7-8):425-45.

239. 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. *J Virol*. 2013;87(13):7301-8.
240. Pasiaka TJ, Collins L, O'Connor MA, Chen Y, Parker ZM, Berwin BL, et al. Bioluminescent imaging reveals divergent viral pathogenesis in two strains of Stat1-deficient mice, and in alphasgamma interferon receptor-deficient mice. *PLoS One*. 2011;6(9):e24018.
241. Danastas K, Miranda-Saksena M, Cunningham AL. Herpes Simplex Virus Type 1 Interactions with the Interferon System. *Int J Mol Sci*. 2020;21(14).
242. Lenschow DJ, Lai C, Frias-Staheli N, Giannakopoulos NV, Lutz A, Wolff T, et al. IFN-stimulated gene 15 functions as a critical antiviral molecule against influenza, herpes, and Sindbis viruses. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2007;104(4):1371-6.
243. Al-khatib K, Williams BR, Silverman RH, Halford W, Carr DJ. The murine double-stranded RNA-dependent protein kinase PKR and the murine 2',5'-oligoadenylate synthetase-dependent RNase L are required for IFN-beta-mediated resistance against herpes simplex virus type 1 in primary trigeminal ganglion culture. *Virology*. 2003;313(1):126-35.
244. Cho H, Proll SC, Szretter KJ, Katze MG, Gale M, Jr., Diamond MS. Differential innate immune response programs in neuronal subtypes determine susceptibility to infection in the brain by positive-stranded RNA viruses. *Nat Med*. 2013;19(4):458-64.
245. Koyuncu OO, Perlman DH, Enquist LW. Efficient retrograde transport of pseudorabies virus within neurons requires local protein synthesis in axons. *Cell Host Microbe*. 2013;13(1):54-66.
246. Enquist LW, Leib DA. Intrinsic and Innate Defenses of Neurons: Detente with the Herpesviruses. *J Virol*. 2017;91(1).
247. 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.
248. Rosato PC, Leib DA. Intrinsic innate immunity fails to control herpes simplex virus and vesicular stomatitis virus replication in sensory neurons and fibroblasts. *J Virol*. 2014;88(17):9991-10001.
249. Schneider WM, Chevillotte MD, Rice CM. Interferon-stimulated genes: a complex web of host defenses. *Annu Rev Immunol*. 2014;32:513-45.

250. Yordy B, Iijima N, Huttner A, Leib D, Iwasaki A. A neuron-specific role for autophagy in antiviral defense against herpes simplex virus. *Cell Host Microbe*. 2012;12(3):334-45.
251. Filtjens J, Roger A, Quatrini L, Wieduwild E, Gouilly J, Hoeffel G, et al. Nociceptive sensory neurons promote CD8 T cell responses to HSV-1 infection. *Nat Commun*. 2021;12(1):2936.
252. Dong X, Levine B. Autophagy and viruses: adversaries or allies? *J Innate Immun*. 2013;5(5):480-93.
253. Cymerys J, Chodkowski M, Slonska A, Krzyzowska M, Banbura MW. Disturbances of mitochondrial dynamics in cultured neurons infected with human herpesvirus type 1 and type 2. *J Neurovirol*. 2019;25(6):765-82.
254. Vo MT, Choi YB. Herpesvirus Regulation of Selective Autophagy. *Viruses*. 2021;13(5).
255. Jakel S, Dimou L. Glial Cells and Their Function in the Adult Brain: A Journey through the History of Their Ablation. *Front Cell Neurosci*. 2017;11:24.
256. Dimou L, Gallo V. NG2-glia and their functions in the central nervous system. *Glia*. 2015;63(8):1429-51.
257. Wolswijk G. Chronic stage multiple sclerosis lesions contain a relatively quiescent population of oligodendrocyte precursor cells. *J Neurosci*. 1998;18(2):601-9.
258. Wennstrom M, Janelidze S, Bay-Richter C, Minthon L, Brundin L. Pro-inflammatory cytokines reduce the proliferation of NG2 cells and increase shedding of NG2 in vivo and in vitro. *PLoS One*. 2014;9(10):e109387.
259. Bell LA, Wallis GJ, Wilcox KS. Reactivity and increased proliferation of NG2 cells following central nervous system infection with Theiler's murine encephalomyelitis virus. *J Neuroinflammation*. 2020;17(1):369.
260. Bradl M, Lassmann H. Oligodendrocytes: biology and pathology. *Acta Neuropathol*. 2010;119(1):37-53.
261. Wakisaka H, Hato N, Honda N, Takahashi H, Kisaki H, Murakami S, et al. Demyelination associated with HSV-1-induced facial paralysis. *Exp Neurol*. 2002;178(1):68-79.

262. Challoner PB, Smith KT, Parker JD, MacLeod DL, Coulter SN, Rose TM, et al. Plaque-associated expression of human herpesvirus 6 in multiple sclerosis. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1995;92(16):7440-4.
263. Pan R, Zhang Q, Anthony SM, Zhou Y, Zou X, Cassell M, et al. Oligodendrocytes that survive acute coronavirus infection induce prolonged inflammatory responses in the CNS. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2020;117(27):15902-10.
264. International Multiple Sclerosis Genetics C. Multiple sclerosis genomic map implicates peripheral immune cells and microglia in susceptibility. *Science*. 2019;365(6460).
265. Kastrukoff LF, Kim SU. Oligodendrocytes from human donors differ in resistance to herpes simplex virus 1 (HSV-1). *Glia*. 2002;38(1):87-92.
266. Siracusa R, Fusco R, Cuzzocrea S. Astrocytes: Role and Functions in Brain Pathologies. *Front Pharmacol*. 2019;10:1114.
267. Jung YJ, Chung WS. Phagocytic Roles of Glial Cells in Healthy and Diseased Brains. *Biomol Ther (Seoul)*. 2018;26(4):350-7.
268. Mahmoud S, Gharagozloo M, Simard C, Gris D. Astrocytes Maintain Glutamate Homeostasis in the CNS by Controlling the Balance between Glutamate Uptake and Release. *Cells*. 2019;8(2).
269. Roth-Cross JK, Bender SJ, Weiss SR. Murine coronavirus mouse hepatitis virus is recognized by MDA5 and induces type I interferon in brain macrophages/microglia. *J Virol*. 2008;82(20):9829-38.
270. Soung A, Klein RS. Viral Encephalitis and Neurologic Diseases: Focus on Astrocytes. *Trends Mol Med*. 2018;24(11):950-62.
271. Shimada IS, LeComte MD, Granger JC, Quinlan NJ, Spees JL. Self-renewal and differentiation of reactive astrocyte-derived neural stem/progenitor cells isolated from the cortical peri-infarct area after stroke. *J Neurosci*. 2012;32(23):7926-40.
272. Morizawa YM, Hirayama Y, Ohno N, Shibata S, Shigetomi E, Sui Y, et al. Author Correction: Reactive astrocytes function as phagocytes after brain ischemia via ABCA1-mediated pathway. *Nat Commun*. 2017;8(1):1598.
273. Enlow W, Bordeleau M, Piret J, Ibanez FG, Uyar O, Venable MC, et al. Microglia are involved in phagocytosis and extracellular digestion during Zika virus encephalitis in young adult immunodeficient mice. *J Neuroinflammation*. 2021;18(1):178.

274. Dong Y, Benveniste EN. Immune function of astrocytes. *Glia*. 2001;36(2):180-90.
275. Christensen JE, Simonsen S, Fenger C, Sorensen MR, Moos T, Christensen JP, et al. Fulminant lymphocytic choriomeningitis virus-induced inflammation of the CNS involves a cytokine-chemokine-cytokine-chemokine cascade. *J Immunol*. 2009;182(2):1079-87.
276. Wiese S, Karus M, Faissner A. Astrocytes as a source for extracellular matrix molecules and cytokines. *Front Pharmacol*. 2012;3:120.
277. Lokensgard JR, Cheeran MC, Hu S, Gekker G, Peterson PK. Glial cell responses to herpesvirus infections: role in defense and immunopathogenesis. *J Infect Dis*. 2002;186 Suppl 2:S171-9.
278. Li Puma DD, Marcocci ME, Lazzarino G, De Chiara G, Tavazzi B, Palamara AT, et al. Ca(2+) -dependent release of ATP from astrocytes affects herpes simplex virus type 1 infection of neurons. *Glia*. 2021;69(1):201-15.
279. Michael BD, Bricio-Moreno L, Sorensen EW, Miyabe Y, Lian J, Solomon T, et al. Astrocyte- and Neuron-Derived CXCL1 Drives Neutrophil Transmigration and Blood-Brain Barrier Permeability in Viral Encephalitis. *Cell Rep*. 2020;32(11):108150.
280. Sierra A, de Castro F, Del Rio-Hortega J, Rafael Iglesias-Rozas J, Garrosa M, Kettenmann H. The "Big-Bang" for modern glial biology: Translation and comments on Pio del Rio-Hortega 1919 series of papers on microglia. *Glia*. 2016;64(11):1801-40.
281. Ginhoux F, Lim S, Hoeffel G, Low D, Huber T. Origin and differentiation of microglia. *Front Cell Neurosci*. 2013;7:45.
282. Hume DA, Perry VH, Gordon S. Immunohistochemical localization of a macrophage-specific antigen in developing mouse retina: phagocytosis of dying neurons and differentiation of microglial cells to form a regular array in the plexiform layers. *J Cell Biol*. 1983;97(1):253-7.
283. Murabe Y, Sano Y. Morphological studies on neuroglia. VII. Distribution of "brain macrophages" in brains of neonatal and adult rats, as determined by means of immunohistochemistry. *Cell Tissue Res*. 1983;229(1):85-95.
284. Kierdorf K, Erny D, Goldmann T, Sander V, Schulz C, Perdiguero EG, et al. Microglia emerge from erythromyeloid precursors via Pu.1- and Irf8-dependent pathways. *Nat Neurosci*. 2013;16(3):273-80.

285. Hutchins KD, Dickson DW, Rashbaum WK, Lyman WD. Localization of morphologically distinct microglial populations in the developing human fetal brain: implications for ontogeny. *Brain Res Dev Brain Res*. 1990;55(1):95-102.
286. Kierdorf K, Prinz M. Microglia in steady state. *J Clin Invest*. 2017;127(9):3201-9.
287. De S, Van Deren D, Peden E, Hockin M, Boulet A, Titen S, et al. Correction: Two distinct ontogenies confer heterogeneity to mouse brain microglia (doi: 10.1242/dev.152306). *Development*. 2019;146(3).
288. Chen SK, Tvrdik P, Peden E, Cho S, Wu S, Spangrude G, et al. Hematopoietic origin of pathological grooming in Hoxb8 mutant mice. *Cell*. 2010;141(5):775-85.
289. Ginhoux F, Greter M, Leboeuf M, Nandi S, See P, Gokhan S, et al. Fate mapping analysis reveals that adult microglia derive from primitive macrophages. *Science*. 2010;330(6005):841-5.
290. Wang Y, Szretter KJ, Vermi W, Gilfillan S, Rossini C, Cella M, et al. IL-34 is a tissue-restricted ligand of CSF1R required for the development of Langerhans cells and microglia. *Nat Immunol*. 2012;13(8):753-60.
291. Blevins G, Fedoroff S. Microglia in colony-stimulating factor 1-deficient op/op mice. *J Neurosci Res*. 1995;40(4):535-44.
292. 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.
293. Hammond BP, Manek R, Kerr BJ, Macauley MS, Plemel JR. Regulation of microglia population dynamics throughout development, health, and disease. *Glia*. 2021;69(12):2771-97.
294. Askew K, Li K, Olmos-Alonso A, Garcia-Moreno F, Liang Y, Richardson P, et al. Coupled Proliferation and Apoptosis Maintain the Rapid Turnover of Microglia in the Adult Brain. *Cell Rep*. 2017;18(2):391-405.
295. Nayak D, Roth TL, McGavern DB. Microglia development and function. *Annu Rev Immunol*. 2014;32:367-402.
296. Chen H, Ye F, Guo G. Revolutionizing immunology with single-cell RNA sequencing. *Cell Mol Immunol*. 2019;16(3):242-9.

297. Zeisel A, Munoz-Manchado AB, Codeluppi S, Lonnerberg P, La Manno G, Jureus A, et al. Brain structure. Cell types in the mouse cortex and hippocampus revealed by single-cell RNA-seq. *Science*. 2015;347(6226):1138-42.
298. Tasic B, Menon V, Nguyen TN, Kim TK, Jarsky T, Yao Z, et al. Adult mouse cortical cell taxonomy revealed by single cell transcriptomics. *Nat Neurosci*. 2016;19(2):335-46.
299. Tan YL, Yuan Y, Tian L. Microglial regional heterogeneity and its role in the brain. *Mol Psychiatry*. 2020;25(2):351-67.
300. Herculano-Houzel S. The remarkable, yet not extraordinary, human brain as a scaled-up primate brain and its associated cost. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2012;109 Suppl 1:10661-8.
301. Verdonk F, Roux P, Flamant P, Fiette L, Bozza FA, Simard S, et al. Phenotypic clustering: a novel method for microglial morphology analysis. *J Neuroinflammation*. 2016;13(1):153.
302. Bruttger J, Karram K, Wortge S, Regen T, Marini F, Hoppmann N, et al. Genetic Cell Ablation Reveals Clusters of Local Self-Renewing Microglia in the Mammalian Central Nervous System. *Immunity*. 2015;43(1):92-106.
303. Wierzba-Bobrowicz T, Kosno-Kruszewska E, Gwiazda E, Lechowicz W. The comparison of microglia maturation in different structures of the human nervous system. *Folia Neuropathol*. 1998;36(3):152-60.
304. Bottcher C, Schlickeiser S, Sneeboer MAM, Kunkel D, Knop A, Paza E, et al. Human microglia regional heterogeneity and phenotypes determined by multiplexed single-cell mass cytometry. *Nat Neurosci*. 2019;22(1):78-90.
305. Stocking C, Kozak CA. Murine endogenous retroviruses. *Cell Mol Life Sci*. 2008;65(21):3383-98.
306. Grabert K, Michoel T, Karavolos MH, Clohisey S, Baillie JK, Stevens MP, et al. Microglial brain region-dependent diversity and selective regional sensitivities to aging. *Nat Neurosci*. 2016;19(3):504-16.
307. Villa A, Della Torre S, Maggi A. Sexual differentiation of microglia. *Front Neuroendocrinol*. 2019;52:156-64.
308. Villa A, Gelosa P, Castiglioni L, Cimino M, Rizzi N, Pepe G, et al. Sex-Specific Features of Microglia from Adult Mice. *Cell Rep*. 2018;23(12):3501-11.

309. Guneykaya D, Ivanov A, Hernandez DP, Haage V, Wojtas B, Meyer N, et al. Transcriptional and Translational Differences of Microglia from Male and Female Brains. *Cell Rep.* 2018;24(10):2773-83 e6.
310. Lively S, Wong R, Lam D, Schlichter LC. Sex- and Development-Dependent Responses of Rat Microglia to Pro- and Anti-inflammatory Stimulation. *Front Cell Neurosci.* 2018;12:433.
311. Yanguas-Casas N, Crespo-Castrillo A, de Ceballos ML, Chowen JA, Azcoitia I, Arevalo MA, et al. Sex differences in the phagocytic and migratory activity of microglia and their impairment by palmitic acid. *Glia.* 2018;66(3):522-37.
312. Gautier EL, Shay T, Miller J, Greter M, Jakubzick C, Ivanov S, et al. Gene-expression profiles and transcriptional regulatory pathways that underlie the identity and diversity of mouse tissue macrophages. *Nat Immunol.* 2012;13(11):1118-28.
313. Chiu IM, Morimoto ET, Goodarzi H, Liao JT, O'Keeffe S, Phatnani HP, et al. A neurodegeneration-specific gene-expression signature of acutely isolated microglia from an amyotrophic lateral sclerosis mouse model. *Cell Rep.* 2013;4(2):385-401.
314. Boche D, Gordon MN. Diversity of transcriptomic microglial phenotypes in aging and Alzheimer's disease. *Alzheimers Dement.* 2021.
315. Bennett ML, Bennett FC, Liddel SA, Ajami B, Zamanian JL, Fernhoff NB, et al. New tools for studying microglia in the mouse and human CNS. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2016;113(12):E1738-46.
316. Wake H, Moorhouse AJ, Jinno S, Kohsaka S, Nabekura J. Resting microglia directly monitor the functional state of synapses in vivo and determine the fate of ischemic terminals. *J Neurosci.* 2009;29(13):3974-80.
317. Akiyoshi R, Wake H, Kato D, Horiuchi H, Ono R, Ikegami A, et al. Microglia Enhance Synapse Activity to Promote Local Network Synchronization. *eNeuro.* 2018;5(5).
318. Hines DJ, Hines RM, Mulligan SJ, Macvicar BA. Microglia processes block the spread of damage in the brain and require functional chloride channels. *Glia.* 2009;57(15):1610-8.
319. Madry C, Attwell D. Receptors, ion channels, and signaling mechanisms underlying microglial dynamics. *J Biol Chem.* 2015;290(20):12443-50.

320. Chamera K, Szuster-Gluszczyk M, Basta-Kaim A. Shedding light on the role of CX3CR1 in the pathogenesis of schizophrenia. *Pharmacol Rep.* 2021;73(4):1063-78.
321. 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.
322. Parkhurst CN, Yang G, Ninan I, Savas JN, Yates JR, 3rd, Lafaille JJ, et al. Microglia promote learning-dependent synapse formation through brain-derived neurotrophic factor. *Cell.* 2013;155(7):1596-609.
323. Tremblay ME. Microglial functional alteration and increased diversity in the challenged brain: Insights into novel targets for intervention. *Brain Behav Immun Health.* 2021;16:100301.
324. Schafer DP, Lehrman EK, Kautzman AG, Koyama R, Mardinly AR, Yamasaki R, et al. Microglia sculpt postnatal neural circuits in an activity and complement-dependent manner. *Neuron.* 2012;74(4):691-705.
325. Borucki DM, Toutonji A, Couch C, Mallah K, Rohrer B, Tomlinson S. Complement-Mediated Microglial Phagocytosis and Pathological Changes in the Development and Degeneration of the Visual System. *Front Immunol.* 2020;11:566892.
326. Trouw LA, Blom AM, Gasque P. Role of complement and complement regulators in the removal of apoptotic cells. *Mol Immunol.* 2008;45(5):1199-207.
327. Fraser DA, Pisalyaput K, Tenner AJ. C1q enhances microglial clearance of apoptotic neurons and neuronal blebs, and modulates subsequent inflammatory cytokine production. *J Neurochem.* 2010;112(3):733-43.
328. Hughes AN, Appel B. Microglia phagocytose myelin sheaths to modify developmental myelination. *Nat Neurosci.* 2020;23(9):1055-66.
329. Sahlender DA, Savtchouk I, Volterra A. What do we know about gliotransmitter release from astrocytes? *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci.* 2014;369(1654):20130592.
330. Davalos D, Grutzendler J, Yang G, Kim JV, Zuo Y, Jung S, et al. ATP mediates rapid microglial response to local brain injury in vivo. *Nat Neurosci.* 2005;8(6):752-8.
331. Haynes SE, Hollopeter G, Yang G, Kurpius D, Dailey ME, Gan WB, et al. The P2Y12 receptor regulates microglial activation by extracellular nucleotides. *Nat Neurosci.* 2006;9(12):1512-9.

332. Braun N, Seigny J, Robson SC, Enjyoji K, Guckelberger O, Hammer K, et al. Assignment of ecto-nucleoside triphosphate diphosphohydrolase-1/cd39 expression to microglia and vasculature of the brain. *Eur J Neurosci.* 2000;12(12):4357-66.
333. van Landeghem FK, Stover JF, Bechmann I, Bruck W, Unterberg A, Buhner C, et al. Early expression of glutamate transporter proteins in ramified microglia after controlled cortical impact injury in the rat. *Glia.* 2001;35(3):167-79.
334. Joost E, Jordao MJC, Mages B, Prinz M, Bechmann I, Krueger M. Microglia contribute to the glia limitans around arteries, capillaries and veins under physiological conditions, in a model of neuroinflammation and in human brain tissue. *Brain Struct Funct.* 2019;224(3):1301-14.
335. Császár E, Lénárt N, Cserép C, Környei Z, Fekete R, Pósfai B, et al. Microglia control cerebral blood flow and neurovascular coupling via P2Y12R-mediated actions. *bioRxiv.* 2021:2021.02.04.429741.
336. Dahm T, Rudolph H, Schwerk C, Schrotten H, Tenenbaum T. Neuroinvasion and Inflammation in Viral Central Nervous System Infections. *Mediators Inflamm.* 2016;2016:8562805.
337. Rock RB, Gekker G, Hu S, Sheng WS, Cheeran M, Lokensgard JR, et al. Role of microglia in central nervous system infections. *Clin Microbiol Rev.* 2004;17(4):942-64, table of contents.
338. Koyuncu OO, Hogue IB, Enquist LW. Virus infections in the nervous system. *Cell Host Microbe.* 2013;13(4):379-93.
339. Lum FM, Low DK, Fan Y, Tan JJ, Lee B, Chan JK, et al. Zika Virus Infects Human Fetal Brain Microglia and Induces Inflammation. *Clin Infect Dis.* 2017;64(7):914-20.
340. Ghoshal A, Das S, Ghosh S, Mishra MK, Sharma V, Koli P, et al. Proinflammatory mediators released by activated microglia induces neuronal death in Japanese encephalitis. *Glia.* 2007;55(5):483-96.
341. Chen CJ, Ou YC, Chang CY, Pan HC, Liao SL, Raung SL, et al. TNF-alpha and IL-1beta mediate Japanese encephalitis virus-induced RANTES gene expression in astrocytes. *Neurochem Int.* 2011;58(2):234-42.
342. Olson JK, Miller SD. Microglia initiate central nervous system innate and adaptive immune responses through multiple TLRs. *J Immunol.* 2004;173(6):3916-24.

343. Fekete R, Cserep C, Lenart N, Toth K, Orsolits B, Martinecz B, et al. Microglia control the spread of neurotropic virus infection via P2Y12 signalling and recruit monocytes through P2Y12-independent mechanisms. *Acta Neuropathol.* 2018;136(3):461-82.
344. Suzuki T, Kohyama K, Moriyama K, Ozaki M, Hasegawa S, Ueno T, et al. Extracellular ADP augments microglial inflammasome and NF-kappaB activation via the P2Y12 receptor. *Eur J Immunol.* 2020;50(2):205-19.
345. Zhang C, Yan Y, He H, Wang L, Zhang N, Zhang J, et al. IFN-stimulated P2Y13 protects mice from viral infection by suppressing the cAMP/EPAC1 signaling pathway. *J Mol Cell Biol.* 2019;11(5):395-407.
346. Chhatbar C, Prinz M. The roles of microglia in viral encephalitis: from sense to therapeutic targeting. *Cell Mol Immunol.* 2021;18(2):250-8.
347. Hazleton JE, Berman JW, Eugenin EA. Purinergic receptors are required for HIV-1 infection of primary human macrophages. *J Immunol.* 2012;188(9):4488-95.
348. He J, Chen Y, Farzan M, Choe H, Ohagen A, Gartner S, et al. CCR3 and CCR5 are co-receptors for HIV-1 infection of microglia. *Nature.* 1997;385(6617):645-9.
349. Shieh JT, Albright AV, Sharron M, Gartner S, Strizki J, Doms RW, et al. Chemokine receptor utilization by human immunodeficiency virus type 1 isolates that replicate in microglia. *J Virol.* 1998;72(5):4243-9.
350. Jordan CA, Watkins BA, Kufta C, Dubois-Dalcq M. Infection of brain microglial cells by human immunodeficiency virus type 1 is CD4 dependent. *J Virol.* 1991;65(2):736-42.
351. Wang G, Zhang J, Li W, Xin G, Su Y, Gao Y, et al. Apoptosis and proinflammatory cytokine responses of primary mouse microglia and astrocytes induced by human H1N1 and avian H5N1 influenza viruses. *Cell Mol Immunol.* 2008;5(2):113-20.
352. Lokensgard JR, Cheeran MC, Gekker G, Hu S, Chao CC, Peterson PK. Human cytomegalovirus replication and modulation of apoptosis in astrocytes. *J Hum Virol.* 1999;2(2):91-101.
353. Furr SR, Marriott I. Viral CNS infections: role of glial pattern recognition receptors in neuroinflammation. *Front Microbiol.* 2012;3:201.

354. Cheeran MC, Hu S, Sheng WS, Rashid A, Peterson PK, Lokensgard JR. Differential responses of human brain cells to West Nile virus infection. *J Neurovirol.* 2005;11(6):512-24.
355. Chen CJ, Ou YC, Chang CY, Pan HC, Liao SL, Chen SY, et al. Glutamate released by Japanese encephalitis virus-infected microglia involves TNF-alpha signaling and contributes to neuronal death. *Glia.* 2012;60(3):487-501.
356. Sariol A, Mackin S, Allred MG, Ma C, Zhou Y, Zhang Q, et al. Microglia depletion exacerbates demyelination and impairs remyelination in a neurotropic coronavirus infection. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2020;117(39):24464-74.
357. Olivarria GM, Cheng Y, Furman S, Pachow C, Hohsfield LA, Smith-Geater C, et al. Microglia do not restrict SARS-CoV-2 replication following infection of the central nervous system of K18-hACE2 transgenic mice. *bioRxiv.* 2021.
358. Vasek MJ, Garber C, Dorsey D, Durrant DM, Bollman B, Soung A, et al. A complement-microglial axis drives synapse loss during virus-induced memory impairment. *Nature.* 2016;534(7608):538-43.
359. Garber C, Soung A, Vollmer LL, Kanmogne M, Last A, Brown J, et al. T cells promote microglia-mediated synaptic elimination and cognitive dysfunction during recovery from neuropathogenic flaviviruses. *Nat Neurosci.* 2019;22(8):1276-88.
360. Cheeran MC, Hu S, Sheng WS, Peterson PK, Lokensgard JR. CXCL10 production from cytomegalovirus-stimulated microglia is regulated by both human and viral interleukin-10. *J Virol.* 2003;77(8):4502-15.
361. Cheeran MC, Hu S, Gekker G, Lokensgard JR. Decreased cytomegalovirus expression following proinflammatory cytokine treatment of primary human astrocytes. *J Immunol.* 2000;164(2):926-33.
362. Moseman EA, Blanchard AC, Nayak D, McGavern DB. T cell engagement of cross-presenting microglia protects the brain from a nasal virus infection. *Sci Immunol.* 2020;5(48).
363. Wheeler DL, Sariol A, Meyerholz DK, Perlman S. Microglia are required for protection against lethal coronavirus encephalitis in mice. *J Clin Invest.* 2018;128(3):931-43.
364. Weinstein DL, Walker DG, Akiyama H, McGeer PL. Herpes simplex virus type I infection of the CNS induces major histocompatibility complex antigen expression on rat microglia. *J Neurosci Res.* 1990;26(1):55-65.

365. 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. *J Neurovirol.* 2001;7(3):208-19.
366. Persson M, Brantefjord M, Liljeqvist JA, Bergstrom T, Hansson E, Ronnback L. Microglial GLT-1 is upregulated in response to herpes simplex virus infection to provide an antiviral defence via glutathione. *Glia.* 2007;55(14):1449-58.
367. 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. *J Virol.* 2012;86(4):2273-81.
368. Aravalli RN, Hu S, Rowen TN, Palmquist JM, Lokensgard JR. Cutting edge: TLR2-mediated proinflammatory cytokine and chemokine production by microglial cells in response to herpes simplex virus. *J Immunol.* 2005;175(7):4189-93.
369. Conrady CD, Zheng M, van Rooijen N, Drevets DA, Royer D, Alleman A, et al. Microglia and a functional type I IFN pathway are required to counter HSV-1-driven brain lateral ventricle enlargement and encephalitis. *J Immunol.* 2013;190(6):2807-17.
370. Preston CM, Harman AN, Nicholl MJ. Activation of interferon response factor-3 in human cells infected with herpes simplex virus type 1 or human cytomegalovirus. *J Virol.* 2001;75(19):8909-16.
371. Jeffries AM, Nitika, Truman AW, Marriott I. The intracellular DNA sensors cGAS and IFI16 do not mediate effective antiviral immune responses to HSV-1 in human microglial cells. *J Neurovirol.* 2020;26(4):544-55.
372. Reinert LS, Rashidi AS, Tran DN, Katzilieris-Petras G, Hvidt AK, Gohr M, et al. Brain immune cells undergo cGAS/STING-dependent apoptosis during herpes simplex virus type 1 infection to limit type I IFN production. *J Clin Invest.* 2021;131(1).
373. Chucair-Elliott AJ, Conrady C, Zheng M, Kroll CM, Lane TE, Carr DJ. Microglia-induced IL-6 protects against neuronal loss following HSV-1 infection of neural progenitor cells. *Glia.* 2014;62(9):1418-34.
374. 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.

375. Hayes CK, Wilcox DR, Yang Y, Coleman GK, Brown MA, Longnecker R. ASC-dependent inflammasomes contribute to immunopathology and mortality in herpes simplex encephalitis. *PLoS Pathog.* 2021;17(2):e1009285.
376. 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. *J Neurovirol.* 2008;14(3):229-38.
377. Cymerys J, Kowalczyk A, Mikolajewicz K, Slonska A, Krzyzowska M. Nitric Oxide Influences HSV-1-Induced Neuroinflammation. *Oxid Med Cell Longev.* 2019;2019:2302835.
378. Gonzalez-Dosal R, Horan KA, Rahbek SH, Ichijo H, Chen ZJ, Mieyal JJ, et al. HSV infection induces production of ROS, which potentiate signaling from pattern recognition receptors: role for S-glutathionylation of TRAF3 and 6. *PLoS Pathog.* 2011;7(9):e1002250.
379. Hu S, Sheng WS, Schachtele SJ, Lokensgard JR. Reactive oxygen species drive herpes simplex virus (HSV)-1-induced proinflammatory cytokine production by murine microglia. *J Neuroinflammation.* 2011;8:123.
380. 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.
381. Sellner J, Simon F, Meyding-Lamade U, Leib SL. Herpes-simplex virus encephalitis is characterized by an early MMP-9 increase and collagen type IV degradation. *Brain Res.* 2006;1125(1):155-62.
382. Zhou Y, Zeng YP, Zhou Q, Guan JX, Lu ZN. The effect of captopril on the expression of MMP-9 and the prognosis of neurological function in herpes simplex encephalitis mice. *Neurol Res.* 2016;38(8):733-9.
383. 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.
384. 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.

385. 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;98(3):447-60.
386. Tsai MS, Wang LC, Tsai HY, Lin YJ, Wu HL, Tzeng SF, et al. Microglia Reduce Herpes Simplex Virus 1 Lethality of Mice with Decreased T Cell and Interferon Responses in Brains. *Int J Mol Sci*. 2021;22(22).
387. Ghiasi H, Roopenian DC, Slanina S, Cai S, Nesburn AB, Wechsler SL. The importance of MHC-I and MHC-II responses in vaccine efficacy against lethal herpes simplex virus type 1 challenge. *Immunology*. 1997;91(3):430-5.
388. Nair A, Hunzeker J, Bonneau RH. Modulation of microglia and CD8(+) T cell activation during the development of stress-induced herpes simplex virus type-1 encephalitis. *Brain Behav Immun*. 2007;21(6):791-806.
389. Lepisto AJ, Frank GM, Xu M, Stuart PM, Hendricks RL. CD8 T cells mediate transient herpes stromal keratitis in CD4-deficient mice. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 2006;47(8):3400-9.
390. Jorgensen I, Rayamajhi M, Miao EA. Programmed cell death as a defence against infection. *Nat Rev Immunol*. 2017;17(3):151-64.
391. Aravalli RN, Hu S, Lokensgard JR. Toll-like receptor 2 signaling is a mediator of apoptosis in herpes simplex virus-infected microglia. *J Neuroinflammation*. 2007;4:11.
392. Aravalli RN, Hu S, Rowen TN, Gekker G, Lokensgard JR. Differential apoptotic signaling in primary glial cells infected with herpes simplex virus 1. *J Neurovirol*. 2006;12(6):501-10.
393. Krzyzowska M, Kowalczyk A, Skulska K, Thorn K, Eriksson K. Fas/FasL Contributes to HSV-1 Brain Infection and Neuroinflammation. *Front Immunol*. 2021;12:714821.
394. Ousman SS, Kubes P. Immune surveillance in the central nervous system. *Nat Neurosci*. 2012;15(8):1096-101.
395. 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.

396. 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. *J Virol.* 2008;82(14):7078-88.
397. Daher KA, Selsted ME, Lehrer RI. Direct inactivation of viruses by human granulocyte defensins. *J Virol.* 1986;60(3):1068-74.
398. Galani IE, Andreakos E. Neutrophils in viral infections: Current concepts and caveats. *J Leukoc Biol.* 2015;98(4):557-64.
399. Carr DJJ, Ash J, Lane TE, Kuziel WA. Abnormal immune response of CCR5-deficient mice to ocular infection with herpes simplex virus type 1. *J Gen Virol.* 2006;87(Pt 3):489-99.
400. Vilela MC, Lima GK, Rodrigues DH, Lacerda-Queiroz N, Pedroso VS, Miranda AS, et al. Absence of CCR5 increases neutrophil recruitment in severe herpetic encephalitis. *BMC Neurosci.* 2013;14:19.
401. Vilela MC, Campos RD, Mansur DS, Rodrigues DH, Lacerda-Queiroz N, Lima GK, et al. Role of IL-4 in an experimental model of encephalitis induced by intracranial inoculation of herpes simplex virus-1 (HSV-1). *Arq Neuropsiquiatr.* 2011;69(2A):237-41.
402. 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. *J Virol.* 1996;70(2):898-904.
403. Daheshia M, Kanangat S, Rouse BT. Production of key molecules by ocular neutrophils early after herpetic infection of the cornea. *Exp Eye Res.* 1998;67(6):619-24.
404. Thomas J, Gangappa S, Kanangat S, Rouse BT. On the essential involvement of neutrophils in the immunopathologic disease: herpetic stromal keratitis. *J Immunol.* 1997;158(3):1383-91.
405. Schachtele SJ, Hu S, Lokensgard JR. Modulation of experimental herpes encephalitis-associated neurotoxicity through sulforaphane treatment. *PLoS One.* 2012;7(4):e36216.
406. Silva MT. Macrophage phagocytosis of neutrophils at inflammatory/infectious foci: a cooperative mechanism in the control of infection and infectious inflammation. *J Leukoc Biol.* 2011;89(5):675-83.

407. Neumann J, Sauerzweig S, Ronicke R, Gunzer F, Dinkel K, Ullrich O, et al. Microglia cells protect neurons by direct engulfment of invading neutrophil granulocytes: a new mechanism of CNS immune privilege. *J Neurosci*. 2008;28(23):5965-75.
408. Kim YR, Kim YM, Lee J, Park J, Lee JE, Hyun YM. Neutrophils Return to Bloodstream Through the Brain Blood Vessel After Crosstalk With Microglia During LPS-Induced Neuroinflammation. *Front Cell Dev Biol*. 2020;8:613733.
409. Ennaciri J, Menezes J, Proulx F, Toledano BJ. Induction of apoptosis by herpes simplex virus-1 in neonatal, but not adult, neutrophils. *Pediatr Res*. 2006;59(1):7-12.
410. Ramakrishna C, Cantin EM. IFN γ inhibits G-CSF induced neutrophil expansion and invasion of the CNS to prevent viral encephalitis. *PLoS Pathog*. 2018;14(1):e1006822.
411. Geissmann F, Manz MG, Jung S, Sieweke MH, Merad M, Ley K. Development of monocytes, macrophages, and dendritic cells. *Science*. 2010;327(5966):656-61.
412. Ginhoux F, Jung S. Monocytes and macrophages: developmental pathways and tissue homeostasis. *Nat Rev Immunol*. 2014;14(6):392-404.
413. Lund H, Pieber M, Parsa R, Han J, Grommisch D, Ewing E, et al. Competitive repopulation of an empty microglial niche yields functionally distinct subsets of microglia-like cells. *Nat Commun*. 2018;9(1):4845.
414. Chen HR, Sun YY, Chen CW, Kuo YM, Kuan IS, Tiger Li ZR, et al. Fate mapping via CCR2-CreER mice reveals monocyte-to-microglia transition in development and neonatal stroke. *Sci Adv*. 2020;6(35):eabb2119.
415. Hashimoto D, Chow A, Noizat C, Teo P, Beasley MB, Leboeuf M, et al. Tissue-resident macrophages self-maintain locally throughout adult life with minimal contribution from circulating monocytes. *Immunity*. 2013;38(4):792-804.
416. Linnavuori K, Hovi T. Herpes simplex virus infection in human monocyte cultures: dose-dependent inhibition of monocyte differentiation resulting in abortive infection. *J Gen Virol*. 1981;52(Pt 2):381-5.
417. Lee SH, Epstein LB. Reversible inhibition by interferon of the maturation of human peripheral blood monocytes to macrophages. *Cell Immunol*. 1980;50(1):177-90.

418. Gosselin J, Flamand L, D'Addario M, Hiscott J, Menezes J. Infection of peripheral blood mononuclear cells by herpes simplex and Epstein-Barr viruses. Differential induction of interleukin 6 and tumor necrosis factor- α . *J Clin Invest*. 1992;89(6):1849-56.
419. Bruun T, Kristoffersen AK, Rollag H, Degre M. Interaction of herpes simplex virus with mononuclear phagocytes is dependent on the differentiation stage of the cells. *APMIS*. 1998;106(2):305-14.
420. Ahmad R, El Bassam S, Cordeiro P, Menezes J. Requirement of TLR2-mediated signaling for the induction of IL-15 gene expression in human monocytic cells by HSV-1. *Blood*. 2008;112(6):2360-8.
421. Fawaz LM, Sharif-Askari E, Menezes J. Up-regulation of NK cytotoxic activity via IL-15 induction by different viruses: a comparative study. *J Immunol*. 1999;163(8):4473-80.
422. Iannello A, Debbeche O, El Arabi R, Samarani S, Hamel D, Rozenberg F, et al. Herpes simplex virus type 1-induced FasL expression in human monocytic cells and its implications for cell death, viral replication, and immune evasion. *Viral Immunol*. 2011;24(1):11-26.
423. Mansur DS, Kroon EG, Nogueira ML, Arantes RM, Rodrigues SC, Akira S, et al. Lethal encephalitis in myeloid differentiation factor 88-deficient mice infected with herpes simplex virus 1. *Am J Pathol*. 2005;166(5):1419-26.
424. Malmgaard L, Melchjorsen J, Bowie AG, Mogensen SC, Paludan SR. Viral activation of macrophages through TLR-dependent and -independent pathways. *J Immunol*. 2004;173(11):6890-8.
425. Ellermann-Eriksen S. Macrophages and cytokines in the early defence against herpes simplex virus. *Virology*. 2005;2:59.
426. Ellermann-Eriksen S, Liberto MC, Iannello D, Mogensen SC. X-linkage of the early in vitro alpha/beta interferon response of mouse peritoneal macrophages to herpes simplex virus type 2. *J Gen Virol*. 1986;67 (Pt 6):1025-33.
427. Pedersen EB, Haahr S, Mogensen SC. X-linked resistance of mice to high doses of herpes simplex virus type 2 correlates with early interferon production. *Infect Immun*. 1983;42(2):740-6.

428. Lang J, Bohn P, Bhat H, Jastrow H, Walkenfort B, Cansiz F, et al. Acid ceramidase of macrophages traps herpes simplex virus in multivesicular bodies and protects from severe disease. *Nat Commun.* 2020;11(1):1338.
429. Zhu X, He Z, Yuan J, Wen W, Huang X, Hu Y, et al. IFITM3-containing exosome as a novel mediator for anti-viral response in dengue virus infection. *Cell Microbiol.* 2015;17(1):105-18.
430. Miettinen JJ, Matikainen S, Nyman TA. Global secretome characterization of herpes simplex virus 1-infected human primary macrophages. *J Virol.* 2012;86(23):12770-8.
431. 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. *J Virol.* 2007;81(3):1451-60.
432. Joffre OP, Segura E, Savina A, Amigorena S. Cross-presentation by dendritic cells. *Nat Rev Immunol.* 2012;12(8):557-69.
433. 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.
434. Soltani S, Mahmoudi M, Farhadi E. Dendritic Cells Currently under the Spotlight; Classification and Subset Based upon New Markers. *Immunol Invest.* 2021;50(6):646-61.
435. Qu C, Brinck-Jensen NS, Zang M, Chen K. Monocyte-derived dendritic cells: targets as potent antigen-presenting cells for the design of vaccines against infectious diseases. *Int J Infect Dis.* 2014;19:1-5.
436. Vollstedt S, Franchini M, Hefti HP, Odermatt B, O'Keeffe M, Alber G, et al. Flt3 ligand-treated neonatal mice have increased innate immunity against intracellular pathogens and efficiently control virus infections. *J Exp Med.* 2003;197(5):575-84.
437. Uyangaa E, Choi JY, Patil AM, Hossain FMA, Park SO, Kim B, et al. Dual TLR2/9 Recognition of Herpes Simplex Virus Infection Is Required for Recruitment and Activation of Monocytes and NK Cells and Restriction of Viral Dissemination to the Central Nervous System. *Front Immunol.* 2018;9:905.
438. 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.

439. 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.
440. 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 Immunol.* 2012;5(2):173-83.
441. Salio M, Cella M, Suter M, Lanzavecchia A. Inhibition of dendritic cell maturation by herpes simplex virus. *Eur J Immunol.* 1999;29(10):3245-53.
442. Bedoui S, Greyer M. The role of dendritic cells in immunity against primary herpes simplex virus infections. *Front Microbiol.* 2014;5:533.
443. Piguet V. Receptor modulation in viral replication: HIV, HSV, HHV-8 and HPV: same goal, different techniques to interfere with MHC-I antigen presentation. *Curr Top Microbiol Immunol.* 2005;285:199-217.
444. Rasmussen SB, Horan KA, Holm CK, Stranks AJ, Mettenleiter TC, Simon AK, et al. Activation of autophagy by alpha-herpesviruses in myeloid cells is mediated by cytoplasmic viral DNA through a mechanism dependent on stimulator of IFN genes. *J Immunol.* 2011;187(10):5268-76.
445. Kather A, Raftery MJ, Devi-Rao G, Lippmann J, Giese T, Sandri-Goldin RM, et al. Herpes simplex virus type 1 (HSV-1)-induced apoptosis in human dendritic cells as a result of downregulation of cellular FLICE-inhibitory protein and reduced expression of HSV-1 antiapoptotic latency-associated transcript sequences. *J Virol.* 2010;84(2):1034-46.
446. Jiang Y, Yin X, Stuart PM, Leib DA. Dendritic Cell Autophagy Contributes to Herpes Simplex Virus-Driven Stromal Keratitis and Immunopathology. *mBio.* 2015;6(6):e01426-15.
447. Mott KR, Ghiasi H. Role of dendritic cells in enhancement of herpes simplex virus type 1 latency and reactivation in vaccinated mice. *Clin Vaccine Immunol.* 2008;15(12):1859-67.
448. 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. *Virol J.* 2017;14(1):37.

449. 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. *J Neurovirol.* 2019;25(3):372-83.
450. Smyth MJ, Cretney E, Kelly JM, Westwood JA, Street SE, Yagita H, et al. Activation of NK cell cytotoxicity. *Mol Immunol.* 2005;42(4):501-10.
451. Abel AM, Yang C, Thakar MS, Malarkannan S. Natural Killer Cells: Development, Maturation, and Clinical Utilization. *Front Immunol.* 2018;9:1869.
452. Scoville SD, Freud AG, Caligiuri MA. Modeling Human Natural Killer Cell Development in the Era of Innate Lymphoid Cells. *Front Immunol.* 2017;8:360.
453. Elliott JM, Yokoyama WM. Unifying concepts of MHC-dependent natural killer cell education. *Trends Immunol.* 2011;32(8):364-72.
454. Campbell TM, McSharry BP, Steain M, Russell TA, Tscharke DC, Kennedy JJ, et al. Functional paralysis of human natural killer cells by alpha herpesviruses. *PLoS Pathog.* 2019;15(6):e1007784.
455. Strickland P, Dunston G, Roane P, Vanderpool E. Multiplication of herpes simplex virus in large granular lymphocytes that co-fractionate with human natural killer cell activity. *Immunol Invest.* 1989;18(6):785-95.
456. Huard B, Fruh K. A role for MHC class I down-regulation in NK cell lysis of herpes virus-infected cells. *Eur J Immunol.* 2000;30(2):509-15.
457. Fitzgerald PA, Mendelsohn M, Lopez C. Human natural killer cells limit replication of herpes simplex virus type 1 in vitro. *J Immunol.* 1985;134(4):2666-72.
458. Baraz L, Khazanov E, Condiotti R, Kotler M, Nagler A. Natural killer (NK) cells prevent virus production in cell culture. *Bone Marrow Transplant.* 1999;24(2):179-89.
459. Chisholm SE, Howard K, Gomez MV, Reyburn HT. Expression of ICP0 is sufficient to trigger natural killer cell recognition of herpes simplex virus-infected cells by natural cytotoxicity receptors. *J Infect Dis.* 2007;195(8):1160-8.
460. Barrow AD, Martin CJ, Colonna M. The Natural Cytotoxicity Receptors in Health and Disease. *Front Immunol.* 2019;10:909.
461. Kassim SH, Rajasagi NK, Ritz BW, Pruett SB, Gardner EM, Chervenak R, et al. Dendritic cells are required for optimal activation of natural killer functions following primary infection with herpes simplex virus type 1. *J Virol.* 2009;83(7):3175-86.

462. Barr DP, Belz GT, Reading PC, Wojtasiak M, Whitney PG, Heath WR, et al. A role for plasmacytoid dendritic cells in the rapid IL-18-dependent activation of NK cells following HSV-1 infection. *Eur J Immunol*. 2007;37(5):1334-42.
463. Vogel K, Thomann S, Vogel B, Schuster P, Schmidt B. Both plasmacytoid dendritic cells and monocytes stimulate natural killer cells early during human herpes simplex virus type 1 infections. *Immunology*. 2014;143(4):588-600.
464. Lee AJ, Chen B, Chew MV, Barra NG, Shenouda MM, Nham T, et al. Inflammatory monocytes require type I interferon receptor signaling to activate NK cells via IL-18 during a mucosal viral infection. *J Exp Med*. 2017;214(4):1153-67.
465. Nandakumar S, Woolard SN, Yuan D, Rouse BT, Kumaraguru U. Natural killer cells as novel helpers in anti-herpes simplex virus immune response. *J Virol*. 2008;82(21):10820-31.
466. Kumaraguru U, Banerjee K, Rouse BT. In vivo rescue of defective memory CD8⁺ T cells by cognate helper T cells. *J Leukoc Biol*. 2005;78(4):879-87.
467. Kim M, Osborne NR, Zeng W, Donaghy H, McKinnon K, Jackson DC, et al. Herpes simplex virus antigens directly activate NK cells via TLR2, thus facilitating their presentation to CD4 T lymphocytes. *J Immunol*. 2012;188(9):4158-70.
468. Tamesis RR, Messmer EM, Rice BA, Dutt JE, Foster CS. The role of natural killer cells in the development of herpes simplex virus type 1 induced stromal keratitis in mice. *Eye (Lond)*. 1994;8 (Pt 3):298-306.
469. Adler H, Beland JL, Del-Pan NC, Kobzik L, Sobel RA, Rimm IJ. In the absence of T cells, natural killer cells protect from mortality due to HSV-1 encephalitis. *J Neuroimmunol*. 1999;93(1-2):208-13.
470. 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.
471. Tuttolomondo A, Colomba C, Di Bona D, Casuccio A, Di Raimondo D, Clemente G, et al. HLA and killer cell immunoglobulin-like receptor (KIRs) genotyping in patients with acute viral encephalitis. *Oncotarget*. 2018;9(25):17523-32.

472. Almerigogna F, Fassio F, Giudizi MG, Biagiotti R, Manuelli C, Chiappini E, et al. Natural killer cell deficiencies in a consecutive series of children with herpetic encephalitis. *Int J Immunopathol Pharmacol*. 2011;24(1):231-8.
473. 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. *Immunol Cell Biol*. 2015;93(10):877-84.
474. Wuest TR, Carr DJ. Dysregulation of CXCR3 signaling due to CXCL10 deficiency impairs the antiviral response to herpes simplex virus 1 infection. *J Immunol*. 2008;181(11):7985-93.
475. Kumar BV, Connors TJ, Farber DL. Human T Cell Development, Localization, and Function throughout Life. *Immunity*. 2018;48(2):202-13.
476. Godfrey DI, Hammond KJ, Poulton LD, Smyth MJ, Baxter AG. NKT cells: facts, functions and fallacies. *Immunol Today*. 2000;21(11):573-83.
477. Stritesky GL, Jameson SC, Hogquist KA. Selection of self-reactive T cells in the thymus. *Annu Rev Immunol*. 2012;30:95-114.
478. Braun RW, Teute HK, Kirchner H, Munk K. Replication of herpes simplex virus in human T lymphocytes: characterization of the viral target cell. *J Immunol*. 1984;132(2):914-9.
479. Nash AA, Quartey-Papafio R, Wildy P. Cell-mediated immunity in herpes simplex virus-infected mice: functional analysis of lymph node cells during periods of acute and latent infection, with reference to cytotoxic and memory cells. *J Gen Virol*. 1980;49(2):309-17.
480. Simmons A. H-2-linked genes influence the severity of herpes simplex virus infection of the peripheral nervous system. *J Exp Med*. 1989;169(4):1503-7.
481. Simmons A, Tschärke DC. Anti-CD8 impairs clearance of herpes simplex virus from the nervous system: implications for the fate of virally infected neurons. *J Exp Med*. 1992;175(5):1337-44.
482. Liu T, Khanna KM, Chen X, Fink DJ, Hendricks RL. CD8(+) T cells can block herpes simplex virus type 1 (HSV-1) reactivation from latency in sensory neurons. *J Exp Med*. 2000;191(9):1459-66.
483. Yu W, Geng S, Suo Y, Wei X, Cai Q, Wu B, et al. Critical Role of Regulatory T Cells in the Latency and Stress-Induced Reactivation of HSV-1. *Cell Rep*. 2018;25(9):2379-89 e3.

484. Mackay LK, Stock AT, Ma JZ, Jones CM, Kent SJ, Mueller SN, et al. Long-lived epithelial immunity by tissue-resident memory T (TRM) cells in the absence of persisting local antigen presentation. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2012;109(18):7037-42.
485. Johnson AJ, Chu CF, Milligan GN. Effector CD4⁺ T-cell involvement in clearance of infectious herpes simplex virus type 1 from sensory ganglia and spinal cords. *J Virol*. 2008;82(19):9678-88.
486. Manickan E, Rouse RJ, Yu Z, Wire WS, Rouse BT. Genetic immunization against herpes simplex virus. Protection is mediated by CD4⁺ T lymphocytes. *J Immunol*. 1995;155(1):259-65.
487. Grubor-Bauk B, Simmons A, Mayrhofer G, Speck PG. Impaired clearance of herpes simplex virus type 1 from mice lacking CD1d or NKT cells expressing the semivariant V alpha 14-J alpha 281 TCR. *J Immunol*. 2003;170(3):1430-4.
488. 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. *J Virol*. 2008;82(22):11073-83.
489. Chan WL, Javanovic T, Lukic ML. Infiltration of immune T cells in the brain of mice with herpes simplex virus-induced encephalitis. *J Neuroimmunol*. 1989;23(3):195-201.
490. Anglen CS, Truckenmiller ME, Schell TD, Bonneau RH. The dual role of CD8⁺ T lymphocytes in the development of stress-induced herpes simplex encephalitis. *J Neuroimmunol*. 2003;140(1-2):13-27.
491. Koyanagi N, Imai T, Shindo K, Sato A, Fujii W, Ichinohe T, et al. Herpes simplex virus-1 evasion of CD8⁺ T cell accumulation contributes to viral encephalitis. *J Clin Invest*. 2017;127(10):3784-95.
492. Lang A, Nikolich-Zugich J. Development and migration of protective CD8⁺ T cells into the nervous system following ocular herpes simplex virus-1 infection. *J Immunol*. 2005;174(5):2919-25.
493. Caignard G, Leiva-Torres GA, Leney-Greene M, Charbonneau B, Dumaine A, Fodil-Cornu N, et al. Genome-wide mouse mutagenesis reveals CD45-mediated T cell function as critical in protective immunity to HSV-1. *PLoS Pathog*. 2013;9(9):e1003637.

494. Menendez CM, Jinkins JK, Carr DJ. Resident T Cells Are Unable To Control Herpes Simplex Virus-1 Activity in the Brain Ependymal Region during Latency. *J Immunol.* 2016;197(4):1262-75.
495. Hudson SJ, Streilein JW. Functional cytotoxic T cells are associated with focal lesions in the brains of SJL mice with experimental herpes simplex encephalitis. *J Immunol.* 1994;152(11):5540-7.
496. 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.
497. Cyster JG, Allen CDC. B Cell Responses: Cell Interaction Dynamics and Decisions. *Cell.* 2019;177(3):524-40.
498. Eibel H, Kraus H, Sic H, Kienzler AK, Rizzi M. B cell biology: an overview. *Curr Allergy Asthma Rep.* 2014;14(5):434.
499. Pillai S, Cariappa A. The follicular versus marginal zone B lymphocyte cell fate decision. *Nat Rev Immunol.* 2009;9(11):767-77.
500. Lam JH, Smith FL, Baumgarth N. B Cell Activation and Response Regulation During Viral Infections. *Viral Immunol.* 2020;33(4):294-306.
501. Kapoor AK, Nash AA, Wildy P. Pathogenesis of herpes simplex virus in B cell-suppressed mice: the relative roles of cell-mediated and humoral immunity. *J Gen Virol.* 1982;61 (Pt 1):127-31.
502. Deshpande SP, Kumaraguru U, Rouse BT. Dual role of B cells in mediating innate and acquired immunity to herpes simplex virus infections. *Cell Immunol.* 2000;202(2):79-87.
503. Gehlhausen JR, Iwasaki A. B cells join T cell clusters in the host response to recurrent herpes simplex virus 2 infection. *J Clin Invest.* 2021;131(9).
504. Da Costa XJ, Brockman MA, Alicot E, Ma M, Fischer MB, Zhou X, et al. Humoral response to herpes simplex virus is complement-dependent. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1999;96(22):12708-12.
505. Deshpande SP, Zheng M, Daheshia M, Rouse BT. Pathogenesis of herpes simplex virus-induced ocular immunoinflammatory lesions in B-cell-deficient mice. *J Virol.* 2000;74(8):3517-24.

506. Beland JL, Sobel RA, Adler H, Del-Pan NC, Rimm IJ. B cell-deficient mice have increased susceptibility to HSV-1 encephalomyelitis and mortality. *J Neuroimmunol.* 1999;94(1-2):122-6.
507. Kelley GR, Ashizawa T, Gyorkey F. Herpes simplex virus encephalitis. A case with dysplastic plasma cell infiltration. *Arch Pathol Lab Med.* 1986;110(1):82-5.
508. Ceroni M, Camana C, Franciotta DM, Bolelli G, Revello MG, Gerna G, et al. Specific activation of B-cell clones within the central nervous system in course of herpes simplex encephalitis. *Boll Soc Ital Biol Sper.* 1990;66(12):1223-30.
509. Linnoila JJ, Binnicker MJ, Majed M, Klein CJ, McKeon A. CSF herpes virus and autoantibody profiles in the evaluation of encephalitis. *Neurol Neuroimmunol Neuroinflamm.* 2016;3(4):e245.
510. Laggis C, Wada D, Shah A, Zussman J. Eosinophils are surprisingly common in biopsy specimens of cutaneous herpes simplex virus and varicella zoster virus infections: Results of a comprehensive histopathologic and clinical appraisal. *J Cutan Pathol.* 2020;47(1):6-11.
511. Hogan SP, Rosenberg HF, Moqbel R, Phipps S, Foster PS, Lacy P, et al. Eosinophils: biological properties and role in health and disease. *Clin Exp Allergy.* 2008;38(5):709-50.
512. Rosenberg HF, Dyer KD, Foster PS. Eosinophils: changing perspectives in health and disease. *Nat Rev Immunol.* 2013;13(1):9-22.
513. Desena A, Graves D, Warnack W, Greenberg BM. Herpes simplex encephalitis as a potential cause of anti-N-methyl-D-aspartate receptor antibody encephalitis: report of 2 cases. *JAMA Neurol.* 2014;71(3):344-6.
514. Krystel-Whittemore M, Dileepan KN, Wood JG. Mast Cell: A Multi-Functional Master Cell. *Front Immunol.* 2015;6:620.
515. Aoki R, Kawamura T, Goshima F, Ogawa Y, Nakae S, Nakao A, et al. Mast cells play a key role in host defense against herpes simplex virus infection through TNF-alpha and IL-6 production. *J Invest Dermatol.* 2013;133(9):2170-9.
516. Royer DJ, Zheng M, Conrady CD, Carr DJ. Granulocytes in Ocular HSV-1 Infection: Opposing Roles of Mast Cells and Neutrophils. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 2015;56(6):3763-75.

517. Karasuyama H, Mukai K, Tsujimura Y, Obata K. Newly discovered roles for basophils: a neglected minority gains new respect. *Nat Rev Immunol.* 2009;9(1):9-13.
518. Voehringer D. Protective and pathological roles of mast cells and basophils. *Nat Rev Immunol.* 2013;13(5):362-75.
519. Day RP, Bienenstock J, Rawls WE. Basophil-sensitizing antibody response to herpes simplex viruses in rabbits. *J Immunol.* 1976;117(1):73-8.
520. Zhu H, Zheng C. The Race between Host Antiviral Innate Immunity and the Immune Evasion Strategies of Herpes Simplex Virus 1. *Microbiol Mol Biol Rev.* 2020;84(4).
521. Wysocka J, Herr W. The herpes simplex virus VP16-induced complex: the makings of a regulatory switch. *Trends Biochem Sci.* 2003;28(6):294-304.
522. Shah AC, Parker JN, Shimamura M, Cassady KA. Spontaneous and Engineered Compensatory HSV Mutants that Counteract the Host Antiviral PKR Response. *Viruses.* 2009;1(3):510-22.
523. Suzutani T, Nagamine M, Shibaki T, Ogasawara M, Yoshida I, Daikoku T, et al. The role of the UL41 gene of herpes simplex virus type 1 in evasion of non-specific host defence mechanisms during primary infection. *J Gen Virol.* 2000;81(Pt 7):1763-71.
524. Koppers-Lalic D, Rijsewijk FAM, Verschuren SBE, van Gaans-van den Brink JAM, Neisig A, Rensing ME, et al. The UL41-encoded virion host shutoff (vhs) protein and vhs-independent mechanisms are responsible for down-regulation of MHC class I molecules by bovine herpesvirus 1. *J Gen Virol.* 2001;82(Pt 9):2071-81.
525. Trgovcich J, Johnson D, Roizman B. Cell surface major histocompatibility complex class II proteins are regulated by the products of the gamma(1)34.5 and U(L)41 genes of herpes simplex virus 1. *J Virol.* 2002;76(14):6974-86.
526. Rao P, Pham HT, Kulkarni A, Yang Y, Liu X, Knipe DM, et al. Herpes simplex virus 1 glycoprotein B and US3 collaborate to inhibit CD1d antigen presentation and NKT cell function. *J Virol.* 2011;85(16):8093-104.
527. Rao P, Wen X, Lo JH, Kim S, Li X, Chen S, et al. Herpes Simplex Virus 1 Specifically Targets Human CD1d Antigen Presentation To Enhance Its Pathogenicity. *J Virol.* 2018;92(22).
528. Daubeuf S, Singh D, Tan Y, Liu H, Federoff HJ, Bowers WJ, et al. HSV ICP0 recruits USP7 to modulate TLR-mediated innate response. *Blood.* 2009;113(14):3264-75.

529. Huang Z, Wu SQ, Liang Y, Zhou X, Chen W, Li L, et al. RIP1/RIP3 binding to HSV-1 ICP6 initiates necroptosis to restrict virus propagation in mice. *Cell Host Microbe*. 2015;17(2):229-42.
530. Guo H, Kaiser WJ, Mocarski ES. Manipulation of apoptosis and necroptosis signaling by herpesviruses. *Med Microbiol Immunol*. 2015;204(3):439-48.
531. Henderson G, Peng W, Jin L, Perng GC, Nesburn AB, Wechsler SL, et al. Regulation of caspase 8- and caspase 9-induced apoptosis by the herpes simplex virus type 1 latency-associated transcript. *J Neurovirol*. 2002;8 Suppl 2:103-11.
532. Zhou G, Galvan V, Campadelli-Fiume G, Roizman B. Glycoprotein D or J delivered in trans blocks apoptosis in SK-N-SH cells induced by a herpes simplex virus 1 mutant lacking intact genes expressing both glycoproteins. *J Virol*. 2000;74(24):11782-91.
533. Waisner H, Kalamvoki M. The ICP0 Protein of Herpes Simplex Virus 1 (HSV-1) Downregulates Major Autophagy Adaptor Proteins Sequestosome 1 and Optineurin during the Early Stages of HSV-1 Infection. *J Virol*. 2019;93(21).
534. Chentoufi AA, Kritzer E, Tran MV, Dasgupta G, Lim CH, Yu DC, et al. The herpes simplex virus 1 latency-associated transcript promotes functional exhaustion of virus-specific CD8⁺ T cells in latently infected trigeminal ganglia: a novel immune evasion mechanism. *J Virol*. 2011;85(17):9127-38.
535. Yang L, Wang M, Cheng A, Yang Q, Wu Y, Jia R, et al. Innate Immune Evasion of Alphaherpesvirus Tegument Proteins. *Front Immunol*. 2019;10:2196.
536. Smith C, Khanna R. Herpesvirus vaccines: challenges and future prospects. *Hum Vaccin*. 2010;6(12):1062-7.
537. van Lint AL, Murawski MR, Goodbody RE, Severa M, Fitzgerald KA, Finberg RW, et al. Herpes simplex virus immediate-early ICP0 protein inhibits Toll-like receptor 2-dependent inflammatory responses and NF-kappaB signaling. *J Virol*. 2010;84(20):10802-11.
538. Hill A, Jugovic P, York I, Russ G, Bennink J, Yewdell J, et al. Herpes simplex virus turns off the TAP to evade host immunity. *Nature*. 1995;375(6530):411-5.
539. Sanchez R, Mohr I. Inhibition of cellular 2'-5' oligoadenylate synthetase by the herpes simplex virus type 1 Us11 protein. *J Virol*. 2007;81(7):3455-64.

540. Frank I, Friedman HM. A novel function of the herpes simplex virus type 1 Fc receptor: participation in bipolar bridging of antiviral immunoglobulin G. *J Virol.* 1989;63(11):4479-88.
541. Steiner I, Benninger F. Update on herpes virus infections of the nervous system. *Curr Neurol Neurosci Rep.* 2013;13(12):414.
542. Kennedy PG, Steiner I. Recent issues in herpes simplex encephalitis. *J Neurovirol.* 2013;19(4):346-50.
543. Uyar O, Plante PL, Piret J, Venable MC, Carbonneau J, Corbeil J, et al. A novel bioluminescent herpes simplex virus 1 for in vivo monitoring of herpes simplex encephalitis. *Sci Rep.* 2021;11(1):18688.
544. Gierasch WW, Zimmerman DL, Ward SL, Vanheyningen TK, Romine JD, Leib DA. Construction and characterization of bacterial artificial chromosomes containing HSV-1 strains 17 and KOS. *J Virol Methods.* 2006;135(2):197-206.
545. Luker GD, Bardill JP, Prior JL, Pica CM, Piwnica-Worms D, Leib DA. Noninvasive bioluminescence imaging of herpes simplex virus type 1 infection and therapy in living mice. *J Virol.* 2002;76(23):12149-61.
546. Brunnemann AK, Liermann K, Deinhardt-Emmer S, Maschkowitz G, Pohlmann A, Sodeik B, et al. Recombinant herpes simplex virus type 1 strains with targeted mutations relevant for aciclovir susceptibility. *Sci Rep.* 2016;6:29903.
547. Morimoto T, Arai J, Akashi H, Kawaguchi Y. Identification of multiple sites suitable for insertion of foreign genes in herpes simplex virus genomes. *Microbiol Immunol.* 2009;53(3):155-61.
548. Oldfield LM, Grzesik P, Voorhies AA, Alperovich N, MacMath D, Najera CD, et al. Genome-wide engineering of an infectious clone of herpes simplex virus type 1 using synthetic genomics assembly methods. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2017;114(42):E8885-E94.
549. Hook L, Hancock M, Landais I, Grabski R, Britt W, Nelson JA. Cytomegalovirus microRNAs. *Curr Opin Virol.* 2014;7:40-6.
550. Cui C, Griffiths A, Li G, Silva LM, Kramer MF, Gaasterland T, et al. Prediction and identification of herpes simplex virus 1-encoded microRNAs. *J Virol.* 2006;80(11):5499-508.

551. Tombacz D, Moldovan N, Balazs Z, Gulyas G, Csabai Z, Boldogkoi M, et al. Multiple Long-Read Sequencing Survey of Herpes Simplex Virus Dynamic Transcriptome. *Front Genet.* 2019;10:834.
552. Russell TA, Stefanovic T, Tschärke DC. Engineering herpes simplex viruses by infection-transfection methods including recombination site targeting by CRISPR/Cas9 nucleases. *J Virol Methods.* 2015;213:18-25.
553. Wu AG, Pruijssers AJ, Brown JJ, Stencel-Baerenwald JE, Sutherland DM, Iskarpatyoti JA, et al. Age-dependent susceptibility to reovirus encephalitis in mice is influenced by maturation of the type-I interferon response. *Pediatr Res.* 2018;83(5):1057-66.
554. Shah AC, Price KH, Parker JN, Samuel SL, Meleth S, Cassady KA, et al. Serial passage through human glioma xenografts selects for a Deltagamma134.5 herpes simplex virus type 1 mutant that exhibits decreased neurotoxicity and prolongs survival of mice with experimental brain tumors. *J Virol.* 2006;80(15):7308-15.
555. Weerasooriya S, DiScipio KA, Darwish AS, Bai P, Weller SK. Herpes simplex virus 1 ICP8 mutant lacking annealing activity is deficient for viral DNA replication. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2019;116(3):1033-42.
556. Dauber B, Pelletier J, Smiley JR. The herpes simplex virus 1 vhs protein enhances translation of viral true late mRNAs and virus production in a cell type-dependent manner. *J Virol.* 2011;85(11):5363-73.
557. Adamson WE, McNab D, Preston VG, Rixon FJ. Mutational analysis of the herpes simplex virus triplex protein VP19C. *J Virol.* 2006;80(3):1537-48.
558. Lin C, Li H, Hao M, Xiong D, Luo Y, Huang C, et al. Increasing the Efficiency of CRISPR/Cas9-mediated Precise Genome Editing of HSV-1 Virus in Human Cells. *Sci Rep.* 2016;6:34531.
559. Yong SJ, Yong MH, Teoh SL, Soga T, Parhar I, Chew J, et al. The Hippocampal Vulnerability to Herpes Simplex Virus Type I Infection: Relevance to Alzheimer's Disease and Memory Impairment. *Front Cell Neurosci.* 2021;15:695738.
560. Marcocci ME, Napoletani G, Protto V, Kolesova O, Piacentini R, Li Puma DD, et al. Herpes Simplex Virus-1 in the Brain: The Dark Side of a Sneaky Infection. *Trends Microbiol.* 2020;28(10):808-20.

561. Ueki H, Wang IH, Fukuyama S, Katsura H, da Silva Lopes TJ, Neumann G, et al. In vivo imaging of the pathophysiological changes and neutrophil dynamics in influenza virus-infected mouse lungs. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2018;115(28):E6622-E9.
562. Roy CN, Benitez Moreno MA, Kline C, Ambrose Z. CG Dinucleotide Removal in Bioluminescent and Fluorescent Reporters Improves HIV-1 Replication and Reporter Gene Expression for Dual Imaging in Humanized Mice. *J Virol*. 2021;95(19):e0044921.
563. Wang Y, Wu H, Wang B, Qi H, Jin Z, Qiu HJ, et al. A NanoLuc Luciferase Reporter Pseudorabies Virus for Live Imaging and Quantification of Viral Infection. *Front Vet Sci*. 2020;7:566446.
564. Jacquemin G, Benavente-Diaz M, Djaber S, Bore A, Dangles-Marie V, Surdez D, et al. Longitudinal high-resolution imaging through a flexible intravital imaging window. *Sci Adv*. 2021;7(25).
565. Heaton NS, Leyva-Grado VH, Tan GS, Eggink D, Hai R, Palese P. In vivo bioluminescent imaging of influenza a virus infection and characterization of novel cross-protective monoclonal antibodies. *J Virol*. 2013;87(15):8272-81.
566. Chung E, Yamashita H, Au P, Tannous BA, Fukumura D, Jain RK. Secreted Gaussia luciferase as a biomarker for monitoring tumor progression and treatment response of systemic metastases. *PLoS One*. 2009;4(12):e8316.
567. Inoue Y, Sheng F, Kiryu S, Watanabe M, Ratanakanit H, Izawa K, et al. Gaussia luciferase for bioluminescence tumor monitoring in comparison with firefly luciferase. *Mol Imaging*. 2011;10(5):377-85.
568. Aswendt M, Adamczak J, Couillard-Despres S, Hoehn M. Boosting bioluminescence neuroimaging: an optimized protocol for brain studies. *PLoS One*. 2013;8(2):e55662.
569. El-Amouri SS, Cao P, Miao C, Pan D. Secreted luciferase for in vivo evaluation of systemic protein delivery in mice. *Mol Biotechnol*. 2013;53(1):63-73.
570. He Q, Liu H, Huang C, Wang R, Luo M, Lu W. Herpes Simplex Virus 1-Induced Blood-Brain Barrier Damage Involves Apoptosis Associated With GM130-Mediated Golgi Stress. *Front Mol Neurosci*. 2020;13:2.
571. Larochelle C, Alvarez JI, Prat A. How do immune cells overcome the blood-brain barrier in multiple sclerosis? *FEBS Lett*. 2011;585(23):3770-80.

572. Unger MS, Schernthaner P, Marschallinger J, Mrowetz H, Aigner L. Microglia prevent peripheral immune cell invasion and promote an anti-inflammatory environment in the brain of APP-PS1 transgenic mice. *J Neuroinflammation*. 2018;15(1):274.
573. Kim YC, Bang D, Lee S, Lee KH. The effect of herpesvirus infection on the expression of cell adhesion molecules on cultured human dermal microvascular endothelial cells. *J Dermatol Sci*. 2000;24(1):38-47.
574. Zhu YP, Shen T, Lin YJ, Chen BD, Ruan Y, Cao Y, et al. Astragalus polysaccharides suppress ICAM-1 and VCAM-1 expression in TNF-alpha-treated human vascular endothelial cells by blocking NF-kappaB activation. *Acta Pharmacol Sin*. 2013;34(8):1036-42.
575. Mark KS, Burroughs AR, Brown RC, Huber JD, Davis TP. Nitric oxide mediates hypoxia-induced changes in paracellular permeability of cerebral microvasculature. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 2004;286(1):H174-80.
576. Fujii S, Akaike T, Maeda H. Role of nitric oxide in pathogenesis of herpes simplex virus encephalitis in rats. *Virology*. 1999;256(2):203-12.
577. Hatton CF, Duncan CJA. Microglia Are Essential to Protective Antiviral Immunity: Lessons From Mouse Models of Viral Encephalitis. *Front Immunol*. 2019;10:2656.
578. Pons V, Rivest S. New Therapeutic Avenues of mCSF for Brain Diseases and Injuries. *Front Cell Neurosci*. 2018;12:499.
579. Boissonneault V, Filali M, Lessard M, Relton J, Wong G, Rivest S. Powerful beneficial effects of macrophage colony-stimulating factor on beta-amyloid deposition and cognitive impairment in Alzheimer's disease. *Brain*. 2009;132(Pt 4):1078-92.
580. Smith AM, Gibbons HM, Oldfield RL, Bergin PM, Mee EW, Curtis MA, et al. M-CSF increases proliferation and phagocytosis while modulating receptor and transcription factor expression in adult human microglia. *J Neuroinflammation*. 2013;10:85.
581. Imai Y, Kohsaka S. Intracellular signaling in M-CSF-induced microglia activation: role of Iba1. *Glia*. 2002;40(2):164-74.
582. Falk LA, Vogel SN. Differential production of IFN-alpha/beta by CSF-1- and GM-CSF-derived macrophages. *J Leukoc Biol*. 1990;48(1):43-9.

583. Fleetwood AJ, Dinh H, Cook AD, Hertzog PJ, Hamilton JA. GM-CSF- and M-CSF-dependent macrophage phenotypes display differential dependence on type I interferon signaling. *J Leukoc Biol.* 2009;86(2):411-21.
584. Tong Y, Zhou L, Yang L, Guo P, Cao Y, Qin FX, et al. Concomitant type I IFN and M-CSF signaling reprograms monocyte differentiation and drives pro-tumoral arginase production. *EBioMedicine.* 2019;39:132-44.
585. De I, Maklakova V, Litscher S, Boyd MM, Klemm LC, Wang Z, et al. Microglial responses to CSF1 overexpression do not promote the expansion of other glial lineages. *J Neuroinflammation.* 2021;18(1):162.
586. Hume DA, MacDonald KP. Therapeutic applications of macrophage colony-stimulating factor-1 (CSF-1) and antagonists of CSF-1 receptor (CSF-1R) signaling. *Blood.* 2012;119(8):1810-20.
587. Tarique AA, Logan J, Thomas E, Holt PG, Sly PD, Fantino E. Phenotypic, functional, and plasticity features of classical and alternatively activated human macrophages. *Am J Respir Cell Mol Biol.* 2015;53(5):676-88.
588. Liu Y, Gordesky-Gold B, Leney-Greene M, Weinbren NL, Tudor M, Cherry S. Inflammation-Induced, STING-Dependent Autophagy Restricts Zika Virus Infection in the *Drosophila* Brain. *Cell Host Microbe.* 2018;24(1):57-68 e3.
589. Wu D, Sanin DE, Everts B, Chen Q, Qiu J, Buck MD, et al. Type 1 Interferons Induce Changes in Core Metabolism that Are Critical for Immune Function. *Immunity.* 2016;44(6):1325-36.
590. Drokhlyansky E, Goz Ayturk D, Soh TK, Chrenek R, O'Loughlin E, Madore C, et al. The brain parenchyma has a type I interferon response that can limit virus spread. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2017;114(1):E95-E104.
591. Wintergerst U, Belohradsky BH. Acyclovir monotherapy versus acyclovir plus beta-interferon in focal viral encephalitis in children. *Infection.* 1992;20(4):207-12.
592. Modi J, Menzie-Sudaram J, Xu H, Trujillo P, Medley K, Marshall ML, et al. Mode of action of granulocyte-colony stimulating factor (G-CSF) as a novel therapy for stroke in a mouse model. *J Biomed Sci.* 2020;27(1):19.

593. Semple BD, Kossmann T, Morganti-Kossmann MC. Role of chemokines in CNS health and pathology: a focus on the CCL2/CCR2 and CXCL8/CXCR2 networks. *J Cereb Blood Flow Metab.* 2010;30(3):459-73.
594. Howe CL, LaFrance-Corey RG, Goddery EN, Johnson RK, Mirchia K. Neuronal CCL2 expression drives inflammatory monocyte infiltration into the brain during acute virus infection. *J Neuroinflammation.* 2017;14(1):238.
595. Seitz S, Clarke P, Tyler KL. Pharmacologic Depletion of Microglia Increases Viral Load in the Brain and Enhances Mortality in Murine Models of Flavivirus-Induced Encephalitis. *J Virol.* 2018;92(16).
596. Zhang J, Li Z, Lu H, Shi J, Gao R, Ma Y, et al. Evidence of Microglial Immune Response Following Coronavirus PHEV Infection of CNS. *Front Immunol.* 2021;12:804625.
597. Seleme MC, Kosmac K, Jonjic S, Britt WJ. Tumor Necrosis Factor Alpha-Induced Recruitment of Inflammatory Mononuclear Cells Leads to Inflammation and Altered Brain Development in Murine Cytomegalovirus-Infected Newborn Mice. *J Virol.* 2017;91(8).
598. Paschalis EI, Lei F, Zhou C, Kapoulea V, Thanos A, Dana R, et al. The Role of Microglia and Peripheral Monocytes in Retinal Damage after Corneal Chemical Injury. *Am J Pathol.* 2018;188(7):1580-96.
599. Goddery EN, Fain CE, Lipovsky CG, Ayasoufi K, Yokanovich LT, Malo CS, et al. Microglia and Perivascular Macrophages Act as Antigen Presenting Cells to Promote CD8 T Cell Infiltration of the Brain. *Front Immunol.* 2021;12:726421.
600. Ai S, Klein RS. Update on T cells in the virally infected brain: friends and foes. *Curr Opin Neurol.* 2020;33(3):405-12.
601. Masuda T, Sankowski R, Staszewski O, Prinz M. Microglia Heterogeneity in the Single-Cell Era. *Cell Rep.* 2020;30(5):1271-81.
602. Lopes KP, Snijders GJL, Humphrey J, Allan A, Sneeboer MAM, Navarro E, et al. Genetic analysis of the human microglial transcriptome across brain regions, aging and disease pathologies. *Nat Genet.* 2022;54(1):4-17.
603. Navin P, Delanty N, Brennan P, Looby S. Herpes simplex virus encephalitis involving the right thalamus. *BMJ Case Rep.* 2013;2013.
604. Garg M, Kulkarni S, Udwardia Hegde A. Herpes simplex encephalitis with thalamic, brainstem and cerebellar involvement. *Neuroradiol J.* 2018;31(2):190-2.

605. Spiteri AG, Terry RL, Wishart CL, Ashhurst TM, Campbell IL, Hofer MJ, et al. High-parameter cytometry unmasks microglial cell spatio-temporal response kinetics in severe neuroinflammatory disease. *J Neuroinflammation*. 2021;18(1):166.
606. Young KF, Gardner R, Sariana V, Whitman SA, Bartlett MJ, Falk T, et al. Can quantifying morphology and TMEM119 expression distinguish between microglia and infiltrating macrophages after ischemic stroke and reperfusion in male and female mice? *J Neuroinflammation*. 2021;18(1):58.
607. Tiwari V, Shukla D. Nonprofessional phagocytosis can facilitate herpesvirus entry into ocular cells. *Clin Dev Immunol*. 2012;2012:651691.
608. 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.
609. Beccari S, Sierra-Torre V, Valero J, García-Zaballa M, Carretero-Guillen A, Capetillo-Zarate E, et al. Microglial phagocytosis dysfunction during stroke is prevented by rapamycin. *bioRxiv*. 2021:2021.11.12.468358.
610. Canivet C, Menasria R, Rheume C, Piret J, Boivin G. Valacyclovir combined with artesunate or rapamycin improves the outcome of herpes simplex virus encephalitis in mice compared to antiviral therapy alone. *Antiviral Res*. 2015;123:105-13.
611. Konishi H, Okamoto T, Hara Y, Komine O, Tamada H, Maeda M, et al. Astrocytic phagocytosis is a compensatory mechanism for microglial dysfunction. *EMBO J*. 2020;39(22):e104464.
612. Benakis C, Garcia-Bonilla L, Iadecola C, Anrather J. The role of microglia and myeloid immune cells in acute cerebral ischemia. *Front Cell Neurosci*. 2014;8:461.
613. Varvel NH, Grathwohl SA, Baumann F, Liebig C, Bosch A, Brawek B, et al. Microglial repopulation model reveals a robust homeostatic process for replacing CNS myeloid cells. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2012;109(44):18150-5.
614. Spiteri AG, Wishart CL, Pamphlett R, Locatelli G, King NJC. Microglia and monocytes in inflammatory CNS disease: integrating phenotype and function. *Acta Neuropathol*. 2022;143(2):179-224.

615. Chhatbar C, Detje CN, Grabski E, Borst K, Spanier J, Ghita L, et al. Type I Interferon Receptor Signaling of Neurons and Astrocytes Regulates Microglia Activation during Viral Encephalitis. *Cell Rep.* 2018;25(1):118-29 e4.
616. Zhang Q, Chen C, Lu J, Xie M, Pan D, Luo X, et al. Cell cycle inhibition attenuates microglial proliferation and production of IL-1beta, MIP-1alpha, and NO after focal cerebral ischemia in the rat. *Glia.* 2009;57(8):908-20.
617. Popp MW, Cho H, Maquat LE. Viral subversion of nonsense-mediated mRNA decay. *RNA.* 2020;26(11):1509-18.
618. Balistreri G, Horvath P, Schweingruber C, Zund D, McInerney G, Merits A, et al. The host nonsense-mediated mRNA decay pathway restricts Mammalian RNA virus replication. *Cell Host Microbe.* 2014;16(3):403-11.
619. Zyzak J, Mitkiewicz M, Leszczynska E, Reniewicz P, Moynagh PN, Siednienko J. HSV-1/TLR9-Mediated IFNbeta and TNFalpha Induction Is Mal-Dependent in Macrophages. *J Innate Immun.* 2020;12(5):387-98.
620. Ma Y, He B. Recognition of herpes simplex viruses: toll-like receptors and beyond. *J Mol Biol.* 2014;426(6):1133-47.
621. Huang Z, Zhou T, Sun X, Zheng Y, Cheng B, Li M, et al. Necroptosis in microglia contributes to neuroinflammation and retinal degeneration through TLR4 activation. *Cell Death Differ.* 2018;25(1):180-9.
622. Block ML, Zecca L, Hong JS. Microglia-mediated neurotoxicity: uncovering the molecular mechanisms. *Nat Rev Neurosci.* 2007;8(1):57-69.
623. Zhao Z, Wang Y, Zhou R, Li Y, Gao Y, Tu D, et al. A novel role of NLRP3-generated IL-1beta in the acute-chronic transition of peripheral lipopolysaccharide-elicited neuroinflammation: implications for sepsis-associated neurodegeneration. *J Neuroinflammation.* 2020;17(1):64.
624. Singh S, Singh G, Tiwari S, Kumar A. CCR2 Inhibition Reduces Neurotoxic Microglia Activation Phenotype After Japanese Encephalitis Viral Infection. *Front Cell Neurosci.* 2020;14:230.
625. Ru W, Liu X, Bae C, Shi Y, Walikonis R, Mo Chung J, et al. Microglia Mediate HIV-1 gp120-Induced Synaptic Degeneration in Spinal Pain Neural Circuits. *J Neurosci.* 2019;39(42):8408-21.

626. Hu X, Zeng Q, Xiao J, Qin S, Wang Y, Shan T, et al. Herpes Simplex Virus 1 Induces Microglia Gasdermin D-Dependent Pyroptosis Through Activating the NLR Family Pyrin Domain Containing 3 Inflammasome. *Front Microbiol.* 2022;13:838808.
627. 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. *J Infect Dis.* 2007;196(6):853-60.