

Université Fédérale



Toulouse Midi-Pyrénées

THÈSE

En vue de l'obtention du

DOCTORAT DE L'UNIVERSITÉ DE TOULOUSE

Délivré par :

Université Toulouse 3 Paul Sabatier (UT3 Paul Sabatier)

Présentée et soutenue par :
Maude ROLLAND

le lundi 5 décembre 2016

Titre :

**Physiopathologie de l'infection par le cytomégalovirus sur les progéniteurs
neuraux humains**

École doctorale et discipline ou spécialité :

ED BSB : Physiopathologie

Unité de recherche :

Inserm UMR 1043 - CNRS UMR 5282

Directeurs de Thèse :

Stéphane CHAVANAS

Christian DAVRINCHE

Daniel DUNIA

Jury :

Dr. Franck HALARY, Rapporteur

Pr. Pierre GRESSENS, Rapporteur

Pr. Flore ROZENBERG, Examinatrice

Pr. Joost VAN MEERWIJK, Professeur

A mon père

Remerciements

Aux membres de mon jury de thèse : Pierre Gressens, Franck Halary, Flore Rozenberg et Joost Van Meerwijk pour l'attention portée à mon travail. Merci de m'avoir fait l'honneur d'être dans mon jury.

A mes deux directeurs de thèse : Christian Davrinche chez qui j'ai commencé ce travail, pour votre gentillesse et votre patience. Merci de m'avoir fait confiance en m'accueillant dans votre équipe. Et Daniel Dunia, qui m'a permis de le finir, pour votre soutien quotidien et votre disponibilité. Merci d'avoir tout mis en place pour que ce travail puisse finir dans les meilleures conditions.

A mon co-directeur Stéphane Chavanas, on s'est donné du mal mais on a fini par faire un très joli papier (avis non-impartial). J'espère que tu en es aussi fier que moi.

Aux anciennes CD devenues DGD :

A Hélène, ma maman canard, qui a guidé mes premiers pas de caneton balbutiant au labo et qui se moque encore de moi quand je me vautre sur les calculs (ça va, ça arrive !). Merci pour ton aide et ton soutien, merci pour Nostalgie dans le L2, les fou rires, les discussions du matin, celle du midi, celles de l'après-midi... Merci pour ton amitié qui a commencé au premier jour et qui continuera bien après la fin. Mais tu vas bien me manquer quand même.

A Mélinda pour sa gentillesse et ses conseils.

A Charlotte pour son enthousiasme et sa bienveillance.

A l'ancienne équipe CD :

A Johan, ne pleures pas j'ai survécu ! Je te souhaite le meilleur dans le pays des hamburgers.

A Charline, parce que tout est en bordel depuis que tu es partie (on s'y attendait)... Hélène a mis Claude François dans le L2, reviens !

A Fred, pour son sourire perpétuel malgré un volume horaire de 26h/j, 8j/semaine. Il y a des gens comme ça qui laisse admiratif.

A Emmeline, pour son humour et sa douceur. Et pour son aide en anglais !

A l'ensemble de l'équipe pour leurs conseils : Nabila, Eric, Bernard, El mostafa, Faouzi.

Aux DGD :

A Cécile Ferré, chère Charogne. Seule une amie peut avoir envie de faire 1h de cardio par 5°C un jour de pluie après une journée dans le L2. Faire la demi-vache à 3 pattes face au soleil couchant créé des liens uniques ☺

A Cécile Malnou, pour la patience dont tu as fait preuve pour me former à l'enseignement, ton attention et tes précieuses recommandations. Et qui va bientôt rajouter à sa double casquette de chercheuse et d'enseignante celle d'escape gameuse professionnelle. Bon courage !

A Anne, pour ta prise en charge maternelle bien que mon cœur soit déjà pris par Hélène. Merci pour ton humour et ta disponibilité (malgré ta capacité de téléportation que je n'ai toujours pas élucidée).

A Elsa, pour ses précieux conseils, scientifiques et autres. Je suis bien contente que tu aies réussi ce concours. Merci aussi pour ton franc-parler, ça fait du bien !

A Marine, all the best pour la suite.

Au plateau d'histologie :

A Christine Salon qui coupe des lames plus vite que son ombre et Florence Capilla qui fait des mises aux points qui marchent du premier coup. Merci pour votre accueil et votre aide quand j'ai commencé à passer mes journées chez vous.

A tous ceux qui m'ont assistée dans ce travail :

Au Dr Yann Sellier pour tes connaissances en histo et ta gentillesse. Bravo docteur !

A Nicolas Cénac et Tereza pour leur aide et leur soutien.

A Xiaojun. Ou Dr Li comme on dit maintenant. J'espère que tu vas bien dans ton lointain pays.

A Jacqueline Aziza pour son investissement.

A l'équipe de M. Peschanski pour nous avoir fourni nos cellules.

A mon clan du labo :

A Gavin, panda indien rentré dans son pays se remplir de sable chaud. Merci pour tout, je ne serais pas là sans toi. Et je sais que tu sais tout ce que je ne dis pas.

A Jen, renard chéri. Qui remonte le moral des troupes à coup de tartes au citron et autres douceurs. Merci de m'avoir materné dans les moments difficiles ;)

A Aurélie, lémurien pharmacien. La thèse, la pharma, l'appart... Une belle année, non ? Bravo pour tout ! Tu me manques au labo mais bon, là c'est le mois sans tabac alors...

A Anne, ma boulette (de riz) aux aventures improbables qui permettent toujours de relativiser. J'espère que vous trouverez votre bunker insonorisé avec Jérôme. En attendant, méfie-toi des ascenseurs.

A Sophie, toujours au taquet, toujours à donf, et toujours avec le sourire.

A Mimi, physicienne dans l'âme qui applique au quotidien la théorie d'Einstein sur la flexibilité du temps.

A Maryse, pour ta bonne humeur et ton humour. Je te souhaite le meilleur pour la suite.

A Delphine, bon courage pour la fin ! Tu auras ensuite tout le temps de t'installer en Ecosse (même si pour la musique irlandaise... je te recommande plutôt l'Irlande : D)

A Christina, drôle et pétillante, un vrai bonheur.

Pour finir, à toute la Dream Team du M2 : Albano, Joris, Marina, Pierre, Arnaud, Mathilde et Michaël.

A mes chers Ecus bordelais, pour leur remontage de moral à coup de cocktails écu et autres. Merci !

A ma Boubou, tout en sensibilité et en gentillesse, merci pour ta présence et ton écoute.

A ma Laura, mon papillon chéri, ma petite anglaise à l'accent breton. Qui remonte le moral au beurre de cacahuète et à la bière. Bon courage pour tes supers projets.

A Arnaud, qui n'a jamais hésité à tendre le pouce pour descendre à Toulouse et qui m'emmène faire du manège quand je vais le voir à Nantes. Un jour on ira voir les neiges du Kilimandjaro ensemble.

A Capucine, ma globetrotteuse. Tes nouvelles et tes photos du bout du monde (notamment celle du pingouin-caillou nazi) ont mis de l'air dans mon travail. Et le bonheur de vous avoir par skype depuis Punta Arenas ! Merci pour tout.

A Oranne, éternel soutien, éternel pilier, Docteur ès Virologie par amitié. Le mot merci est trop petit pour ce que j'ai à te dire. Je t'aime.

A tous ceux qui m'ont soutenus lors de cette thèse.

A ma famille,

A mes grands-parents et plus largement à l'ensemble de ma famille.

A ma mère qui a trouvé le courage de se mettre en danger pour choisir son travail. Je suis fière de toi.

A mon père, mon plus grand soutien. Merci de ta patience et de ton écoute, pour ton aide, pour tout, merci, merci, merci. Je n'y serais pas arrivé sans toi.

A Hélène, mon bébé rat, je sais tout ce que je te dois mon amour.

A Nico, qui me supporte malgré le stress et la fatigue. Je t'aime

A Sacha, ma force et mon bonheur.

Corrections

Ce travail porte sur l'impact de l'infection par le HCMV sur les progéniteurs neuraux humains, plus précisément, le travail sur la neuronogénèse s'intéresse à l'effet du virus sur la différenciation des cellules souche neurales humaines. Les conséquences de l'infection sur la prolifération de ces cellules n'ont pas été étudiées.

P7 (milieu) : « l'activation pharmacologique ou l'expression ectopique de PPAR γ » suffit...

P16 : « Le CMV seul herpes transmis de la mère au fœtus ou au nouveau-né » Faux: non, Le CMV est un herpesvirus transmis de la mère au fœtus ou au nouveau-né comme le HSV et le VZV.

P17 : « Le *risque transmission augmente avec âge maternel* » Non. Le risque de transmission augmente avec l'âge de la grossesse.

P17 (III, A) : « syndromes mononucléosiques » et non « mononucléoses ».

P19-20 : Les estimations faites aux USA sont différentes de celles faites en France. En effet, le dépistage néo-natal se fait plus tôt en France via diagnostic échographique (dès 20-22 SA) conduisant à des IMG pour les cas les plus graves. Le nombre d'enfant avec des séquelles très graves de l'infection congénitale par le HCMV est donc plus faible en France.

P21 : L'efficacité du valaciclovir comme traitement prénatal est controversée : il y a un biais dans l'étude lié à la définition des formes cliniques « graves » ou « modérées ».

P21 (milieu) : Le Letermovir (AIC246) est un inhibiteur de la terminase virale, les essais cliniques de ce candidat médicament ont été abandonnés. En effet, malgré des tests *in vitro* montrant une spécificité et une efficacité excellentes sur le HCMV, il s'est avéré très toxique *in vivo*.

P21: D. Heiden *et al.*, Training clinicians treating HIV to diagnose cytomegalovirus retinitis. *Bull World Health Organ.* (2014).

P22 : gB : La protéine gB interagit avec le TLR2 (Boehme *et al*, 2006) et DC-SIGN/DC-SIGNR (Halary *et al*, 2002). C'est une protéine de fusion. Elle permet la fusion de l'enveloppe virale avec la membrane plasmique (chandramouli *et al*, 2015 ; Burke *et al*, 2015).

S. chandramouli *et al.*, Structure of HCMV glycoprotein B in the postfusion conformation bound to a neutralizing human antibody. *Nat Commun* (2015).

H. Burke *et al.*, Crystal Structure of the Human Cytomegalovirus Glycoprotein B. *PLoS Pathog.* (2015).

KW Boehme *et al.*, Human cytomegalovirus envelope glycoproteins B and H are necessary for TLR2 activation in permissive cells. *J Immunol.* 177:7094–7102 (2006).

P22 (bas) : « gH assure la fusion de l'enveloppe virale avec la membrane cellulaire » en tant que partenaire de la protéine de fusion gB.

P23 : Le terme « complexe gH » doit être remplacé par « complexe pentamérique », à propos de celui-ci voir :

A. Kabanova *et al.*, Antibody-driven design of a human cytomegalovirus gHgLpUL128L subunit vaccine that selectively elicits potent neutralizing antibodies. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 111(50): 17965–17970 (2014).

P25 : Concernant les stratégies vaccinales, il ajouter l'utilisation récente de VLP CMV exprimant la gB native et qui semblent prometteuses en vaccination (phase I/II en cours aux USA).

M. Kirchmeier *et al.*, Enveloped Virus-Like Particle Expression of Human Cytomegalovirus Glycoprotein B Antigen Induces Antibodies with Potent and Broad Neutralizing Activity. *Clin Vaccine Immunol.* 21(2): 174–180 (2014).

P27 (milieu) : Des études récentes montrent que la macropinocytose est impliquée dans l'entrée du HCMV dans plusieurs types cellulaires.

S. Hetzenecker *et al.*, HCMV induces macropinocytosis for host cell entry in fibroblasts. *Traffic.* 17, 351–368. 10.1111/tra.12355 (2016).

P28 : Les protéines très précoces sont impliquées indirectement dans synthèse ADN.

P30: les corps denses peuvent également être sécrétés.

P31-32: JH Kim *et al.*, HCMV requires EGFR signaling to enter and initiate the early steps in the establishment of latency in CD34+ human progenitor cells. *J Virol.* 01206-16 (2016).

SH. Lee *et al.*, Long and Short Isoforms of the Human Cytomegalovirus UL138 Protein Silence IE Transcription and Promote Latency. *J Virol.* 29;90(20):9483-94 (2016).

K. Caviness *et al.*, Complex Interplay of the UL136 Isoforms Balances Cytomegalovirus Replication and Latency. *MBio.* 7(2):e01986 (2016).

P36 : D. « autres rôles connus » à la place de « rôles physiologiques »

P39 : L'infection congénitale par le HCMV constitue la 1^{ère} cause infectieuse d'anomalie cérébrale

P41 : « les cellules *prolifèrent dans des « niches » restrictives dans l'espace* ». En effet, les zones du cerveau où se trouvent les cellules souches sont très définies dans l'espace.

P43: maintien et pas maintenance

P45: leading edge = front de migration

P45 : « la migration neurale commence de la 8^e à la 20^e semaine de gestation » chez l'homme.

P46: cellules gliales radiales=glie radiaire

P48 : Concernant la différenciation en neurones :

Les cellules souches neurales corticales précoces (NSCs), également appelées progéniteurs apicaux (AP), résident dans un épithélium polarisé avec leurs surfaces apicales formant la lumière du tube (futurs ventricules). Les neurones dérivent de progéniteurs intermédiaires (IP) de la zone sous-ventriculaire (SVZ) ou des cellules de la glie radiaire externe (oRG). Les IPs se divisent généralement dans la SVZ et ont un potentiel de division cellulaire limité. Ils se divisent de manière symétrique pour générer deux neurones postmitotiques ou, plus rarement, deux IPs. Ces cellules se divisent à la surface apicale et expriment des marqueurs de la neuronogénèse. Les IP amplifient le nombre de progéniteurs neuronaux produits par division AP. Les mammifères ont également des progéniteurs dans la SVZ externe qui ont une morphologie radiale mais qui n'ont pas d'attache à la membrane apicale. En effet, il existe une région proliférative étendue appelée SVZ externe (OSVZ) dans le néocortex humain en développement qui contient la majorité des cellules progénitrices pendant les périodes clés de la neurogénèse. Des études récentes se sont concentrées sur cette nouvelle classe de cellules souches neurales trouvée dans l'OSVZ, appelées cellules de la glie radiaire externes (oRG). Ces oRG se divisent de façon asymétrique afin de se renouveler et permettent l'amplification de ce lignage intermédiaire. Contrairement aux cellules de la glie radiaire, les cellules oRG sont situées loin du ventricule, sans contact apical avec la surface lumineuse, mais elles possèdent une longue fibre basale qui s'étend souvent jusqu'à la surface piaie. Les oRG peuvent amplifier davantage la production d'AP et contribuer à l'expansion et à la giration du cortex.

N. D. Dwyer *et al.*, Neural Stem Cells to Cerebral Cortex: Emerging Mechanisms Regulating Progenitor Behavior and Productivity. *Journal of Neuroscience.* 36 (45) 11394-11401(2016).

B. E. Lamonica *et al.*, OSVZ progenitors in the human cortex: an updated perspective on neurodevelopmental disease. *Current Opinion in Neurobiology.* 22:747–753 (2012).

SC Noctor *et al.*, Cortical neurons arise in symmetric and asymmetric division zones and migrate through specific phases. *Nat Neurosci.* 7:136–144 (2004).

A. Sessa *et al.*, Tbr2 directs conversion of radial glia into basal precursors and guides neuronal amplification by indirect neurogenesis in the developing neocortex. *Neuron* 60:56–69 (2008).

W.A. Tyler *et al.*, Neural precursor lineages specify distinct neocortical pyramidal neuron types. *J Neurosci.* 35:6142–6152 (2015).

P51 : Une première description avait déjà fait en 1958.

H. BRUNNSCHWEILER, [Incomplete suture of corpus callosum in a case of lissencephalia of the two hemispheres; organogenetic relations between these two diseases]. *Schweiz Arch Neurol Psychiatr.* 195-208 (1958).

P54 : *A nidulans* (*Aspergillus nidulans*) est une espèce de champignons filamenteux du genre *Aspergillus*. Il est traditionnellement utilisé comme modèle d'étude sur les Eucaryotes.

P60 : Chez l'homme, les progéniteurs neuraux sont également une cible pour le HCMV.

N. Teissier *et al.*, Cytomegalovirus-induced brain malformations in fetuses. *J Neuropathol Exp Neurol.* 73(2):143-58 (2014).

P63 : Nous souhaitons également étudier s'il existe un lien entre l'expression de la b3 tubuline et PPAR γ .

P71 : fig.4.D. Ces résultats préliminaires indiquent une tendance. Les étoiles des statistiques ne doivent pas être prises en compte.

P75 (bas) : Il existe des méthodes de CRISPR-Cas9 que nous souhaiterions mettre en place qui permettent une réduction de l'expression de PPAR γ , et non une extinction complète qui serait fatale pour les cellules.

Y. Niu *et al.*, Generation of gene-modified cynomolgus monkey via Cas9/RNA-mediated gene targeting in one-cell embryos. *Cell*. 156(4):836-43 (2014).

Y. Chen *et al.*, Germline acquisition of Cas9/RNA-mediated gene modifications in monkeys. *Cell Res*. 25(2):262-5 (2015).

SOMMAIRE

SOMMAIRE.....	6
RESUME.....	9

ABSTRACT	11
ABREVIATIONS	12
INTRODUCTION	15
LE CYTOMEGALOVIRUS HUMAIN	16
I. Généralités.....	16
A- Historique	16
B- Classification	17
II. Epidémiologie	18
A- Transmission horizontale.....	19
B- Transmission nosocomiale	19
III. Clinique.....	20
A- Personnes immunocompétentes.....	20
B- Personnes immuno-déficientes	20
C- Infection congénitale	21
1. Infection du placenta	21
2. Infection cérébrale	21
IV. Traitements.....	24
A- Traitements des personnes immuno-déficientes	24
B- Traitement de l'infection congénitale.....	24
V. Structure du virion et stratégies vaccinales	25
A- L'enveloppe.....	25
B- Le tégment.....	26
C- La capsid.....	26
D- Le génome	27
E- Stratégies vaccinales.....	27
VI. Le cycle viral.....	29
A- Entrée du virus	29
B- Le cycle productif.....	31
1. La phase très précoce (IE – Immediate Early).....	31
2. La phase précoce (E - Early)	32
3. La phase tardive (L - Late)	33
C- Le cycle latent et la réactivation	34
VII. La famille des Peroxisome Proliferator Activated Receptors gamma (PPAR γ).....	36
A- Généralités sur les PPAR	36
B- Activation de PPAR γ	36
C- Structure et rôles transcriptionnels de PPAR γ	37

1.	Structure	37
2.	Rôle trans-activateur.....	37
3.	Rôle trans-répresseur	38
D-	Rôles physiologiques.....	39
E-	Rôles dans la grossesse.....	41
1.	Dans le placenta	41
2.	Dans le cerveau	41
	LES CELLULES SOUCHES NEURALES	43
I.	Le développement cérébral	44
A-	Généralités.....	44
B-	Prolifération des cellules souches et progéniteurs neuraux	45
C-	Migration des cellules souches neurales (NSC)	48
D-	Différenciation en neurones	51
II.	La lissencéphalie	54
A-	Généralités.....	54
B-	Lissencephaly 1 (LIS1)	56
1.	Fonctions	56
2.	Association avec la lissencéphalie.....	57
C-	La doublecortine (DCX).....	59
1.	Fonctions	59
2.	Association avec la lissencéphalie.....	60
	RESULTATS	62
I.	L'activation de PPAR γ lors de l'infection par le HCMV inhibe la neuronogénèse dans les cellules souches neurales humaines.....	63
II.	L'infection par le HCMV induit une surexpression de LIS1 et DCX	69
	DISCUSSION ET PERSPECTIVES	77
	BIBLIOGRAPHIE	85
	FIGURES ET TABLEAUX.....	97
	ANNEXES.....	99

RESUME

L'infection congénitale par le cytomégalo virus humain (HCMV) est la première cause de séquelles acquises du système nerveux central (CNS). Elle est responsable de surdités neurosensorielles, de paralysies cérébrales ou d'anomalies neuro-développementales graves (0,1% des naissances) telles que des microcéphalies ou des anomalies de gyration.

Pour étudier les effets de l'infection par le HCMV sur le développement cérébral, nous utilisons des cellules souches neurales (NSC) humaines dérivées de cellules souches embryonnaires (ES), ainsi que des coupes histologiques de cerveaux fœtaux infectés. Notre travail a porté sur

l'analyse des conséquences de l'infection sur un facteur de transcription essentiel lors du développement cérébral, le Peroxisome Proliferator-Activated Receptor gamma (PPAR γ). Nous avons démontré que l'infection par le HCMV diminuait la neuronogénèse, en association avec une augmentation des niveaux d'expression et d'activité de PPAR γ . En accord avec ces résultats, nous avons montré que le niveau d'expression de l'acide 9-hydroxyoctadécadiénoïque (9-HODE), un agoniste connu de PPAR γ , était augmenté dans les NSC infectées. En outre, l'ajout de 9-HODE dans les NSC reproduit l'effet de l'infection sur PPAR γ , conduisant à une augmentation du nombre de cellules positives pour l'antigène viral IE parmi les NSC infectées. De plus, nous avons démontré que : (1) l'activation pharmacologique ou l'expression ectopique de PPAR γ suffisent pour perturber la neuronogénèse de NSC non infectées ; (2) le traitement de NSC non infectées par le 9-HODE diminue la différenciation des NSC ; (3) le traitement de NSC infectées par du T0070907, un inhibiteur de PPAR γ , restaure un taux normal de différenciation.

Le rôle crucial de PPAR γ dans les pathologies fœtales liées à l'infection a été souligné par la mise en évidence de sa translocation nucléaire au sein des zones germinatives de cerveaux fœtaux infectés congénitalement par le HCMV (N=20), mais pas dans les cas contrôles.

Nous avons également identifié un des gènes cibles de PPAR γ dans le cerveau infecté: LIS1, le gène de la lissencéphalie classique, dont l'expression est également augmentée dans les NSC infectées, de façon dépendante de l'activité de PPAR γ . Nous avons mis en évidence que l'expression de LIS1 était augmentée de façon massive dans les cerveaux fœtaux infectés congénitalement par le HCMV (N=6) par rapport aux cas contrôles (N=3). Ceci pourrait jouer un rôle central dans la physiopathologie, car il est connu que toute perturbation de l'expression de LIS1 conduit à des anomalies importantes de la migration neurale et au développement d'un phénotype dit "lissencephaly-like".

L'ensemble de nos données révèle le rôle clé de PPAR γ dans la neuronogénèse et la pathophysiologie de l'infection congénitale par le HCMV. Elles ouvrent la voie à une meilleure compréhension des mécanismes régissant les phénotypes pathologiques, notamment concernant le rôle de LIS1 dans les anomalies de la migration neurale.

ABSTRACT

Congenital infection by human cytomegalovirus (HCMV) is a leading cause of permanent sequelae of the central nervous system, including sensorineural deafness, cerebral palsies or devastating neurodevelopmental abnormalities (0.1 % of all births).

To gain insight on the impact of HCMV on neuronal development, we used both neural stem cells from human embryonic stem cells (NSC) and brain sections from infected fetuses. We investigated the outcome of infection on Peroxisome Proliferator-Activated Receptor gamma (PPAR γ), a transcription factor critical in the developing brain. We observed that HCMV infection dramatically impaired the rate of neuronogenesis and strongly increased PPAR γ levels

and activity. Consistent with these findings, levels of 9-hydroxyoctadecadienoic acid (9-HODE), a known PPAR γ agonist, were significantly increased in infected NSCs. Likewise, exposure of uninfected NSCs to 9-HODE recapitulated the effect of infection on PPAR γ activity. It also increased the rate of cells expressing the IE antigen in HCMV-infected NSCs. Further, we demonstrated that (1) pharmacological activation of ectopically expressed PPAR γ was sufficient to induce impaired neurogenesis of uninfected NSCs, (2) treatment of uninfected NSCs with 9-HODE impaired NSC differentiation and (3) treatment of HCMV infected NSCs with the PPAR γ inhibitor T0070907 restored a normal rate of differentiation. The role of PPAR γ in the disease phenotype was strongly supported by the immunodetection of nuclear PPAR γ in brain germinative zones of congenitally infected fetuses (N=20), but not in control samples. We also identified LIS1 as one of the target genes for PPAR γ in the infected brain. Levels of LIS1, the gene of classical lissencephaly, were strongly increased in infected NSC, presumably resulting from increased PPAR γ activity. The relevance of this finding was further supported by our demonstration of a massive increase in the immunodetection in LIS1 fetal brains congenitally infected with HCMV (N = 6), relative to control cases (N = 3). Indeed, it is well known that overexpression of LIS1 is responsible for significant abnormalities of neural migration and development of a lissencephaly-like phenotype.

Altogether, our findings reveal a key role for PPAR γ in neurogenesis and in the pathophysiology of HCMV congenital infection. They also pave the way to the identification of PPAR γ gene targets in the infected brain.

ABBREVIATIONS

CBA: Cytometric Bead Array

CDK: Cyclin-Dependent Kinase

COX2: cyclooxygenase 2

DC-SIGN: Dendritic Cell-Specific ICAM3-Grabbing non-integrin

DISC: Disabled Infectious Single Cycle

EGFR: Endothelial Growth Factor Receptor

ES: Embryonic Stem cells

HCMV: Human Cytomegalovirus
HODE: Hydroxy-octadecadienoic acid
IE: Immediate Early
IFN: Interferon
iPS: Induced Pluripotent Stem cell
KO: Knock-out
LOX: Lipoxygenase
MAP: Microtubule-Associated Protein
MCMV: Murine Cytomegalovirus
MHC: Major Histocompatibility Complex
MIEP: Major Immediate Early Promoter
M.O.I: Multiplicity of infection
MT: Microtubule
NPC: Neural Progenitor Cell
NSPC: Neural Stem Progenitor Cell
NSC: Neural Stem cell
ORF: Open Reading Frame
PAF: Platelet-Activating Factor
PAFAH1B1: Platelet-Activating Factor Acetylhydrolase 1b, Regulatory Subunit 1
PGE2: Prostaglandin E2
PKR: Protein Kinase R
PLA2: Phospholipase A2
PPAR: Peroxisome Proliferator Activated Receptor
PPRE: PPAR Response Element
PTAFR: Platelet-Activating Factor Receptor
RELN: Reelin
RXR: Retinoic X Receptor
CNS: Central Nervous System
SLITRK6: SLIT And NTRK Like Family Member 6
STAT: Signal Transducer and Activator of Transcription
TBPC: Trophoblast Progenitor Cells
TLR: Toll-Like Receptors

TZD: Thiazolidinedione

UL: Unique Long

US: Unique Short

VEGF: Vascular Endothelial Growth Factor

HIV: Human Immunodeficiency Virus

15d-PGJ2: 15-Deoxy-Delta-12, 14-prostaglandin J2

INTRODUCTION

LE CYTOMEGALOVIRUS HUMAIN

I. Généralités

A- Historique

Le 27 juin 1881, lors d'une conférence de la "Natural History Society of Prussian Rhineland and Westphalia", le Dr. Ribbert rapporte le cas d'un enfant mort-né avec des symptômes « syphilis-like » possédant énormément de cellules « cytomégaliqes » au niveau des reins et de la glande parotide. Ces cellules dites « cytomégaliqes » se caractérisent par une taille très augmentée et des inclusions nucléaires (Reddehase, 2006).

En 1904, Jesionek et Kiolemenoglou observent à nouveau ces cellules dans le foie, les poumons et les reins d'un fœtus syphilitique. Dans un article intitulé « Finding of protozoan-like structures in the organs of an inherited infected luetic fetus », ils décrivent que ces éléments mesurent 20-30 μm de diamètre, les noyaux sont larges et chacun contient un « corps nucléaire central ». C'est la première description des cellules en « œil de chouette », pathognomonique du cytomegalovirus et toujours utilisée aujourd'hui pour le diagnostic (Halwachs-Baumann, 2011).

Les premières études *in vitro* montrent un effet cytopathique spécifique. Les cellules infectées paraissent rondes et beaucoup plus grosses, avec l'inclusion d'un corps viral intracellulaire (Albrecht and Weller, 1980). Plusieurs théories expliquent ces phénomènes : l'influx de calcium, la suppression de la synthèse de fibronectine ou la sous-régulation des intégrines.

B- Classification

Le cytomegalovirus humain (HCMV) ou HHV5 (Human HerpesVirus 5) appartient à la famille des herpesviridae (Tableau 1). Cette famille contient un nombre important de virus enveloppés. Leur taille varie de 150 à 300 nm. La structure des virions des Herpesvirus comprend : un génome à ADN linéaire, une capsidie entourée par un tégument composé de phosphoprotéines et une enveloppe. Cette famille se caractérise par sa capacité à infecter les cellules de manière latente, avec des réactivations périodiques. Les Herpesviridae comprennent 3 sous-familles : α , β et γ .

Herpesvirus	Abbreviation		Size (kb)
	Common	Formal	
<i>Alphaherpesvirinae</i>			
<i>Simplexvirus</i>			
Herpes simplex virus type 1	HSV-1	HHV-1	152
Herpes simplex virus type 2	HSV-2	HHV-2	155
<i>Varicellovirus</i>			
Varicella-zoster virus	VZV	HHV-3	125
<i>Betaherpesvirinae</i>			
<i>Cytomegalovirus</i>			
HCMV	HCMV	HHV-5	227–236
<i>Roseolovirus</i>			
Human herpesvirus type 6	HHV-6	HHV-6	159–162
Human herpesvirus type 7	HHV-7	HHV-7	144–153
<i>Gammaherpesvirinae</i>			
<i>Lymphocryptovirus</i>			
EBV	EBV	HHV-4	172–173
<i>Rhadinovirus</i>			
Human herpesvirus type 8	HHV-8	HHV-8	134–138

Tableau 1. Classification des herpèsvirus humains. (Crough and Khanna, 2009)

Le HCMV est un β -herpèsvirus. Le virion mature mesure 150 à 200 nm de diamètre. Sa capside icosaédrique de 100 nm contient les 235 kb de son génome (Fig. 1).

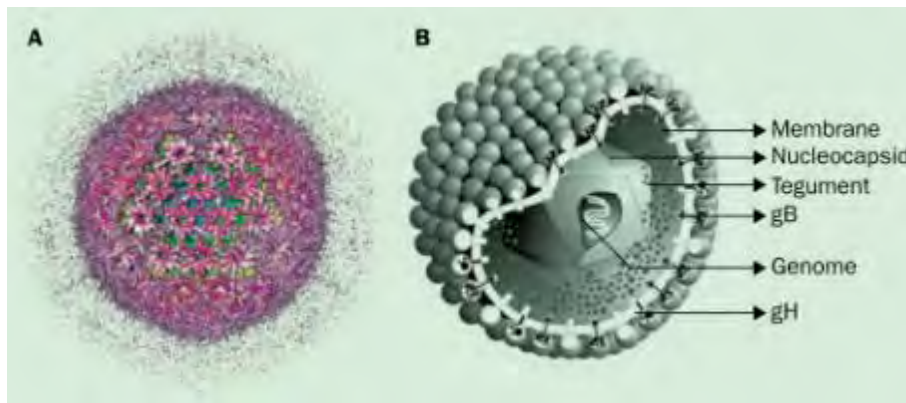


Fig. 1. Le cytomégalovirus humain. Représentations de la surface et de la capside de la particule (180nm) en 2 (A) et 3 dimensions (B). (Gandhi and Khanna, 2004)

II. Epidémiologie

La séroprévalence du HCMV varie de 30 à 70 % dans les pays développés et peut monter à 100 % dans les pays en voie de développement (Pass, 1985). Cette prévalence augmente avec l'âge des individus. La prévalence est plus importante chez les femmes que chez les hommes.

Elle est plus importante dans les pays défavorisés et dans les classes sociales les plus basses des pays développés (Stowell et al., 2014).

A- Transmission horizontale

Le virus se transmet par tous les fluides corporels : sang, urine, salive, sécrétions sexuelles... La transmission nécessite d'être directement au contact du matériel infectieux. Après une première acquisition du virus, le virus reste présent dans les urines et/ou la salive et/ou les larmes et/ou le sperme et sécrétions vaginales durant plusieurs mois, voire des années. Les principales sources de l'infection sont l'activité sexuelle et le contact avec les enfants. Les pics d'infection ont généralement lieu dans la petite enfance (passage en crèche) ou à l'adolescence (début de la vie sexuelle). La prévalence du HCMV est plus élevée chez les gens ayant connu un grand nombre de partenaires sexuels (Coonrod et al., 1998), ainsi que chez les parents de jeunes enfants ou les travailleurs de la petite enfance (Murph et al., 1986).

B- Transmission nosocomiale

La transfusion sanguine et la transplantation d'organe sont des sources d'infection lorsque le donneur est séropositif.

C- Transmission verticale

Le CMV est le seul herpèsvirus qui se transmet de la mère au fœtus ou au nouveau-né. Il existe trois voies d'infection : transplacentaire, intrapartum et via l'allaitement. La transmission intrapartum concerne les femmes qui ont une infection HCMV productive et qui produisent du virus infectieux au niveau du vagin et du col de l'utérus au moment de l'accouchement. Si le virus est présent dans le tractus génital au moment de l'accouchement, la probabilité d'infection de l'enfant est d'environ 50 % (Reynolds et al., 1973). Les nouveau-nés contaminés durant l'accouchement ont une virémie négative pendant les trois premières semaines de vie et commencent à excréter du virus à partir de six semaines. La transmission mère-enfant peut également avoir lieu lors de l'allaitement. A partir d'un mois, les nouveau-nés nourris par des mères séropositives ont 39 % de probabilité de s'infecter (Dworsky et al., 1983). 25 % des enfants allaités par des mères séropositives pour le HCMV s'infectent avant un an d'âge. Les infections transplacentaires concernent aussi bien les primo-infections (deux tiers des cas) que les réactivations ou les réinfections (un tiers des cas). Dans les autres cas, le système immunitaire maternel assure une protection contre la transmission intra-utérine. La transmission au fœtus survient dans environ 30 % à 40 % des cas de primo-infection maternelle et dans environ 2 % des cas lors d'une infection récurrente.

L'infection du fœtus requiert l'infection du placenta, qui sert à la fois de porte d'entrée et de site de réplication virale (Fisher et al., 2000). Ce mode d'infection est responsable de la majorité des séquelles observées chez les nouveau-nés. Un grand nombre de facteurs influencent la transmission materno-fœtale : le trimestre d'exposition au virus, l'âge maternel, l'immunité maternelle, la charge virale. Le risque de transmission au fœtus augmente avec l'âge maternel (Cheeran et al., 2009).

III. Clinique

A- Personnes immunocompétentes

Chez l'individu sain, l'infection est généralement asymptomatique. Elle peut cependant induire des mononucléoses et, dans de rares cas, des atteintes plus graves du tractus intestinal ou du système nerveux central (Klemola et al., 1970) (Tableau 2).

2 Non-exhaustive list of recognised potential manifestations of cytomegalovirus disease ⁷⁸	
Direct effects	
Gastrointestinal	Cardiovascular
Colitis	Myocarditis
Enteritis	Venous thrombosis
Gastritis	Neurological
Hepatitis	Meningitis
Pancreatitis	Encephalitis
Cholangitis	Myelitis
Respiratory	Retinitis
Pneumonitis	Uveitis
Haematological	Urological
Thrombocytopenia	Nephritis
Leukopenia	Prostatitis
Anaemia	
Disseminated intravascular coagulation	
Myelodysplastic change	
Indirect effects	
Atherosclerosis acceleration	Accelerated AIDS progression
Graft dysfunction and rejection	Increased opportunistic infections

Tableau 2. Liste non exhaustive des manifestations pathologiques de l'infection HCMV.

(Lancini et al., 2014)

B- Personnes immuno-déficientes

L'infection par le HCMV est une cause de mortalité chez les personnes immuno-déficientes, que cette immunodéficiences soit due à une greffe ou à une infection par le HIV. Les complications liées au HCMV sont plus importantes dans le cadre d'une transplantation d'un donneur séropositif vers un receveur séronégatif. Lors des transplantations, l'infection ou la réactivation du HCMV peuvent induire des atteintes multi-organes : myocardites, lésions gastro-intestinales, pneumopathies, encéphalites... L'infection par le HCMV est une cause importante de mortalité chez les receveurs de greffes de moelle osseuse (Small, 1996).

C'est l'infection virale la plus fréquente chez les transplantés rénaux. L'infection par le HCMV est aussi impliquée dans les rejets d'allogreffes aigus et chroniques (Sagedal et al., 2002).

Chez les personnes infectées par le HIV, l'infection ou la réactivation ont des conséquences dépendantes du taux de lymphocytes T CD4⁺ du patient. Les symptômes les plus fréquents sont des rétinites, parfois associées à des colites, des encéphalites ou des neuropathies périphériques (Foca et al., 2012).

C- Infection congénitale

1. Infection du placenta

La transmission materno-fœtale de l'infection HCMV est hématogène. Le placenta est toujours infecté avant le fœtus. Le HCMV est responsable d'une pathologie du placenta. Le virus se répand via les vaisseaux sanguins utérins infectés. Il se réplique dans les cellules déciduales au niveau de l'épithélium glandulaire et de l'endothélium lymphatique, dans les cytotrophoblastes, les cellules du muscle lisse des vaisseaux sanguins des villosités, le chorion et les progéniteurs trophoblastiques (TBPC) (Pereira et al., 2014). Cette infection des TBPC *in vitro* induit une dérégulation de protéines clés requises pour l'auto-renouvellement et la différenciation, empêche la division correcte de ces cellules et leur développement en cellules placentaires matures (Tabata et al., 2015). Ceci interfère avec les premiers stades de croissance des néo-villosités. L'infection est associée à une forte augmentation des œdèmes, des villosités avasculaires et la présence d'une inflammation (Pereira et al., 2014). L'infection diminue la différenciation des cytotrophoblastes infectés. Dans ce cadre, l'infection du fœtus peut passer par deux voies : via les syncytiotrophoblastes ou via les cytotrophoblastes invasifs (Fisher et al., 2000). Les capacités de migration et d'invasion du cytotrophoblaste sont également affectées (Rauwel et al., 2010). Cette altération de l'invasion des cellules engendre un dysfonctionnement du remodelage tissulaire, notamment une villite. Ce défaut de remodelage est responsable d'une diminution de la micro-vascularisation placentaire et d'une réduction de l'afflux sanguin maternel. L'accès du fœtus aux nutriments est diminué, ce qui provoque des retards de croissance intra-utérins et peut être la cause de naissances prématurées (Pereira and Maidji, 2008). Dans 15 % des cas, la primo-infection maternelle conduit à un avortement spontané précoce.

2. Infection cérébrale

L'infection par le HCMV est la première cause mondiale de séquelles à long terme chez le nouveau-né et l'enfant (0.6 % des naissances aux Etats-Unis) (Fig. 2) (Cannon, 2009). 1 à 4 % des nouveau-nés sont infectés congénitalement par le HCMV chaque année.

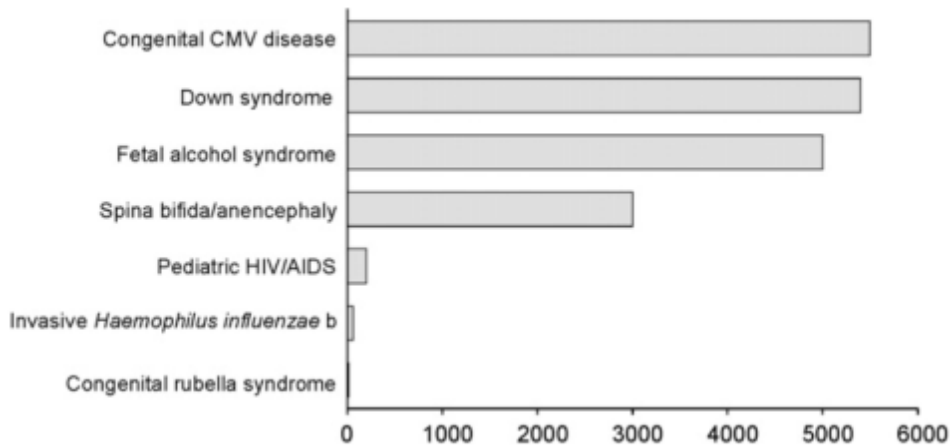


Fig. 2. Nombre annuel d'enfants avec des séquelles à long terme à cause de pathologies diverses en 2009 aux USA. (Cannon, 2009)

L'infection du fœtus *in utero* se caractérise par un taux élevé de réplication virale et une atteinte multi-organe : hypotrophie, hépatite, hépatosplénomégalie, anémie, anomalies du système nerveux central (Hamprecht et al., 2001). Plus de 80 % des enfants infectés congénitalement naissent asymptomatiques (Fig. 3). Environ 10 à 15 % de ces enfants développeront des séquelles tardives, essentiellement un déficit auditif. La majorité des enfants symptomatiques à la naissance développent des séquelles à long terme, mais les enfants asymptomatiques peuvent également développer des séquelles, notamment cognitives et neurosensorielles.

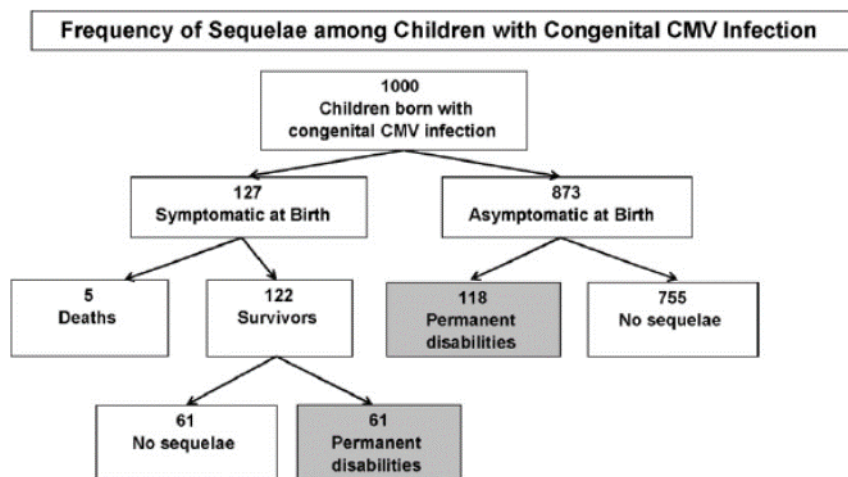


Fig. 3. Fréquence des séquelles chez les enfants infectés congénitalement par le HCMV en 2009 aux USA. (Cannon, 2009)

Les séquelles cognitives sont plus graves quand le fœtus est infecté lors du premier trimestre (microcéphalie, lissencéphalie...). Des retards mentaux sévères sont fréquemment décrits (60 % des cas symptomatiques) dans le suivi à long terme des enfants survivants. Un déficit auditif neurosensoriel est observé dans 50 % des cas et 12 % des enfants symptomatiques meurent de la suite de leurs séquelles durant la période néonatale (Fisher et al., 2000).

Au total, plus de 20 % des enfants infectés congénitalement par le HCMV conservent des séquelles (surdité, cécité, paralysies cérébrales, faiblesse cognitive...) (Fig. 4).

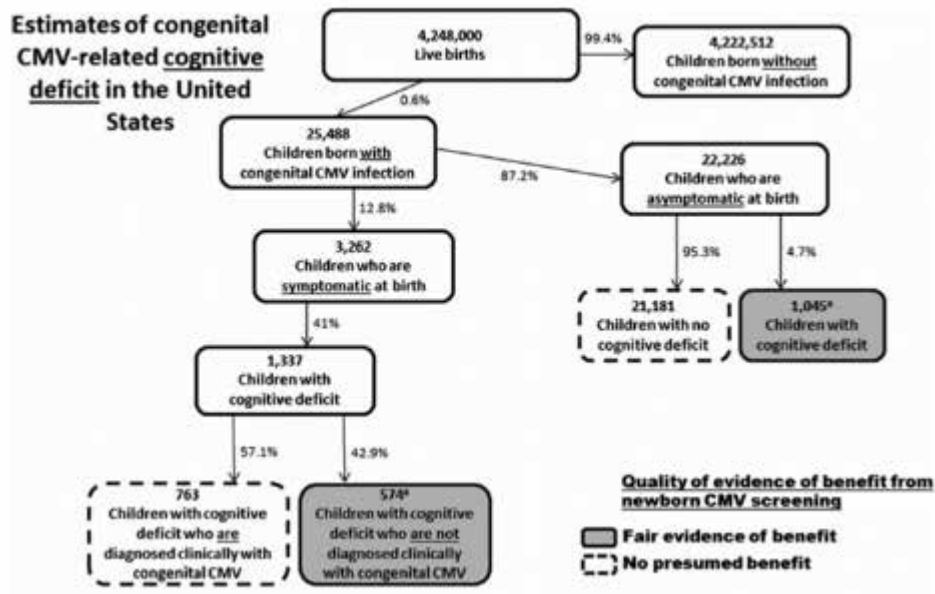


Fig. 4. Nombre annuel d'enfants avec un déficit cognitif dû au HCMV aux USA en 2014. (Cannon et al., 2014)

Les anomalies cérébrales les plus précoces rapport es dans la littérature ont été observ es à 28 semaines de grossesse par résonance magnétique ou ultrasonogramme. Les lésions *in utero* les plus communes dues à l'infection sont les dilatations ventriculaires, la gliose de la matière blanche, l'atrophie cérébrale, les kystes parenchymaux et  pendymaux, la présence de calcifications et de malformations corticales (généralement polymicrogyrie). Parmi les anomalies observ es de façon post-natale, les plus fréquentes sont les calcifications cérébrales (50 % des cas) (Fig. 5).

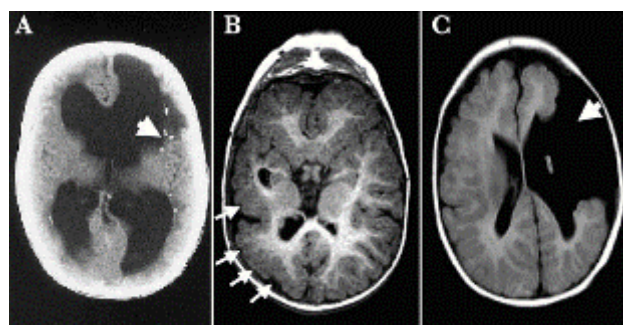


Fig. 5. Anomalies neurologiques dues à une altération du développement du CNS à cause de l'infection par le HCMV. (A) Calcifications p rivoentriculaires (B) Polymicrogyrie (C) Kyste porencéphalique associé à une schizoc phalie. (Cheeran et al., 2009)

Une étude a mis en évidence une corrélation entre les dommages cérébraux, la charge virale du tissu et la fonctionnalité du placenta (Gabrielli et al., 2012).

Les dommages cérébraux dus au CMV peuvent résulter d'une réplication virale lytique incontrôlée, de dommages dus aux lymphocytes T CD8⁺, d'une hypoxie foetale, ces trois mécanismes ayant lieu en présence d'une insuffisance placentaire. Bien que controversées, certaines études proposent un lien entre l'infection congénitale par le HCMV et des défauts de développement du langage ou de l'autisme (Sweeten et al., 2004) (Yamashita et al., 2003). Le virus est retrouvé dans le sang mais aussi dans le liquide céphalo-rachidien des enfants congénitalement infectés. Ceci s'explique par le fait que le HCMV a un tropisme pour le système nerveux central. Chez l'animal, il a été démontré que le virus peut infecter le cerveau provoquer des encéphalites et des séquelles neurologiques (Cinque et al., 1997).

IV. Traitements

A- Traitements des personnes immuno-déficientes

Il existe plusieurs molécules antivirales permettant de lutter contre l'infection par le HCMV. Le Ganciclovir est un analogue de la guanosine qui peut s'incorporer dans l'ADN et inhiber la réplication du virus. Ce médicament est majoritairement administré aux transplantés, en prophylaxie et en traitement. Le Cidofovir (analogue de la cytosine) est donné quand les souches virales sont résistantes au Ganciclovir. Il existe d'autres traitements sur le marché comme le Foscarnet, ou en phase d'essai clinique comme l'AIC246. L'ensemble de ces traitements cherche à inhiber la réplication virale. L'infection ou la réactivation du virus chez les patients atteints par le HIV est surtout symptomatique lorsque le taux de LT CD4⁺ est diminué. Il a été montré que 21 % des patients développent une maladie à CMV dans les deux ans quand leur taux de LT CD4⁺ est inférieur à 100/ μ l, contre 10 % chez ceux qui ont un taux supérieur (Gallant et al., 1992).

B- Traitement de l'infection congénitale

Il n'existe pas de traitement standard de l'infection à HCMV durant la grossesse. Il a cependant été montré que l'immunisation passive de femmes enceintes (par injection de globulines « hyperimmunes » anti-HCMV par voie intraveineuse) semble protéger le fœtus de l'infection congénitale (Nigro et al., 2005). Une étude récente a été faite *in utero* sur des fœtus symptomatiques de l'infection par le HCMV. Ces fœtus présentaient des anomalies du développement neurologique et neurosensoriel. Le traitement à haute dose au valacyclovir de la mère semble restreindre le développement des symptômes et 82 % des enfants traités étaient asymptomatiques à la naissance, contre 43 % des non traités (Leruez-Ville et al., 2016). Plusieurs traitements postnataux ont aussi été essayés.

Les traitements antiviraux postnataux semblent capables d'améliorer le phénotype de surdité chez les enfants symptomatiques à la naissance. Les effets n'ont pas été étudiés chez les enfants asymptomatiques (de Vries et al., 2011). Le Ganciclovir a été utilisé en traitement précoce chez les nouveau-nés infectés congénitalement et semble capable de prévenir la détérioration auditive de 6 mois à un an après la naissance (Kimberlin et al., 2003). Ce traitement semble également limiter le développement des atteintes neurologiques (Prendergast et al., 2012). Malgré des résultats prometteurs, le traitement au Ganciclovir présente de sérieuses limitations. Les tests chez l'animal ont montré une toxicité hématologique avec neutropénie persistante et une atteinte de la moelle osseuse ainsi qu'une induction de la stérilité. Le traitement du nouveau-né est associé à des neutropénies sévères (63 % des cas). Les conséquences du traitement à long terme ne sont pas connues actuellement (Gunkel et al.) (Oliver et al., 2009).

V. Structure du virion et stratégies vaccinales

A- L'enveloppe

L'enveloppe est une bicouche lipidique qui provient du réticulum endoplasmique (RE) ou du compartiment intermédiaire RE/ Golgi. Elle contient huit glycoprotéines transmembranaires exprimées à la surface du virion, notamment: gL, gO, gB, gH, gM et gN. Les quatre dernières sont essentielles pour la production de particules virales infectieuses.

gB : La protéine gB est très conservée entre les CMV des différentes espèces. C'est une glycoprotéine membranaire de 110-116 kDa. Elle est capable de lier l'héparine et est nécessaire à l'adhésion sur les héparanes-sulfates lors de la phase d'adhésion du virus (Compton et al., 1993).

gM/gN : La protéine gM est la glycoprotéine la plus abondante à la surface virale (10 % de la masse du virion). Cette protéine est très conservée chez tous les herpèsvirus (α , β et γ). Sa séquence en acides aminés présente peu de variabilité, ce qui suggère une faible pression de sélection sur cette glycoprotéine ou des contraintes structurelles faisant qu'elle ne tolère que de faibles variations de séquence. Elle forme un complexe avec la protéine gN dans le RE. La structure et la variabilité de séquence de gN sont spécifiques du HCMV. La variabilité de sa séquence en acides aminés résulte d'une sélection positive permettant l'échappement à la réponse anticorps. gN permet aussi une interaction avec les heparan-sulfates.

Le complexe gH/gL/gO : gH et gL forment le complexe gCIII. gH assure la fusion de l'enveloppe virale avec la membrane cellulaire.

Elle est une cible pour les anticorps neutralisants, qui bloquent la fusion des membranes et la pénétration du virus (Simpson et al., 1993). Comme les protéines gH des autres herpèsvirus, la protéine gH du HCMV nécessite la co-expression avec gL pour le transport intracellulaire. La protéine gL sert de chaperonne pour la bonne localisation de gH. L'association avec la protéine gO semble augmenter la capacité de fusion du complexe. gO n'est pas nécessaire pour la production de virus infectieux *in vitro*. Elle permet également l'incorporation du complexe gH/gL dans l'enveloppe. En effet, l'incorporation de gH dans l'enveloppe doit être limitée pour que le virus soit infectieux.

Le complexe gH : La protéine gH peut également s'associer avec les protéines gL, UL128, UL130 et UL131 pour former le complexe pentamérique dit « complexe gH ». Les protéines UL128-131 doivent se lier simultanément à l'association gH/gL (Ryckman et al., 2008). Ce complexe permet l'entrée du virus notamment dans les cellules endothéliales et épithéliales (Wang and Shenk, 2005). Il est une cible majeure des anticorps neutralisants (Wussow et al., 2012).

L'ensemble de ces données suggèrent que la stœchiométrie des glycoprotéines d'enveloppe requises pour la production de particules virales infectieuses est variable, et donc, que l'assemblage de l'enveloppe est structurellement moins restreinte par rapport à la capsidie qui est très hautement organisée (Britt and Boppana, 2004).

B- Le tégument

Le tégument se définit comme l'espace entre l'enveloppe lipidique et les protéines de capsidie. Il est amorphe et non structuré, bien que des associations entre les protéines du tégument et la capsidie aient été observées. Le tégument comprend un grand nombre de protéines (71 sur les 192 observées dans les virions infectieux). Bien que les protéines du tégument soient majoritairement virales, ce compartiment contient aussi des protéines cellulaires embarquées. En général, les protéines virales contenues dans le tégument sont phosphorylées. (Kalejta, 2008). Ces protéines seront libérées dans le cytoplasme de la cellule infectée. Elles ont 2 rôles majeurs : un rôle structural dans l'assemblage et le désassemblage du virion et un rôle dans la régulation de la réponse immunitaire et la réplication virale (Crough and Khanna, 2009).

C- La capsidie

La capsidie icosaédrique se compose de 12 pentons, 150 hexons et 320 triplexes (Trus et al., 1999).

Cinq protéines forment la capsid codées par cinq séquences : *UL86* code pour la protéine MCP (Major Capsid Protein), *UL85* code pour Minor Capsid Protein, *UL46* pour Minor Protein Binding Protein, *UL48-49* codent pour SCP (Smallest Capsid Protein), *UL80* pour des protéines d'assemblage. MCP est la protéine la plus abondante de la capsid (960 copie), elle forme les pentons et hexons de la capsid. Minor Capsid Protein (2 copies) et Minor Protein Binding Protein (une copie) sont des protéines mineures qui forment des trimères et viennent se positionner entre les pentons et les hexons. SCP est nécessaire à l'assemblage des particules virales infectieuses (Britt and Boppana, 2004).

D- Le génome

Le génome du HCMV comporte 235kb. C'est le plus grand génome des herpèsvirus humain. Le génome se divise en 2 séquences uniques : une séquence courte unique (US) et une séquence longue unique (UL). La région UL est encadrée par des séquences répétées TRL (Terminal Repeat Long) et IRL (Internal Repeat Long), alors que les séquences TRS (Terminal Repeat Short) et IRS (Internal Repeat Short) entourent la région US. Les séquences répétées terminales sont toujours présentes (Sijmons et al., 2014).

Les régions présentes aux extrémités du génome permettent l'encapsidation de celui-ci grâce à des éléments conservés : *pac-1* et *pac-2*. Le premier séquençage complet du virus a été publié en 1990 et portait sur la souche de laboratoire AD169. Sa séquence est déletée de 19 ORF (Open Reading Frame) par rapport aux souches cliniques. Cependant, cette réduction de taille du génome a également été retrouvée chez certaines souches cliniques. Suite à des recombinaisons, il existe quatre formes isomériques du génome selon le sens de lecture des séquences UL et US. Le génome code pour environ 200 ORF (Dunn et al., 2003). La majorité des transcrits du HCMV font entre 1 et 4 kb mais des ARNm supérieurs à 10 kb peuvent aussi être produits. (Ma et al., 2012).

E- Stratégies vaccinales

Il n'existe aucun vaccin disponible à ce jour. Plusieurs stratégies vaccinales ont pourtant été essayées. Des essais de vaccin vivant atténué sont en cours depuis les années 1970. Dans ce cadre, un vaccin basé sur la souche de laboratoire Towne a été conçu. Cette souche a été atténuée par 125 passages sur des fibroblastes. Cependant, ce vaccin a été testé sur des transplantés rénaux et s'est avéré incapable de les protéger contre l'infection par le HCMV. Des vaccins utilisant des protéines virales immunogènes ont également été testés. Plusieurs tests ont été réalisés notamment avec la glycoprotéine B, la protéine pp65 ou la protéine IE1 (Fig. 6).

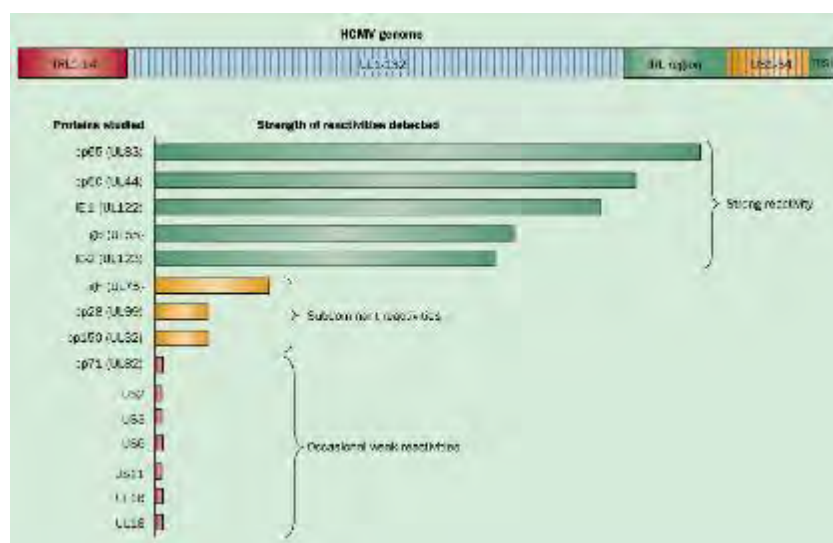


Fig. 6. Représentation schématique de la force des réponses des lymphocytes T CD4⁺ et CD8⁺ contre les différents antigènes du CMV. (Gandhi and Khanna, 2004)

Malheureusement, il n'a pas été démontré d'efficacité satisfaisante dans ces tests, même si certains sont toujours en phase d'essais cliniques. Plusieurs techniques sont encore à l'essai, en utilisant les corps denses ou des peptides immunogènes (Fig. 7) (Schleiss, 2008). La protéine gB reste cependant un candidat prometteur, de par sa capacité à induire l'immunité adaptative. Elle est aussi une cible des anticorps neutralisants. Un vaccin basé sur la protéine gB recombinante additionnée à l'adjuvant MF59 est en phase II d'essai clinique et semble capable de prévenir l'infection par le HCMV (Schleiss, 2009). Le complexe gH est également une cible majeure des anticorps neutralisants (Freed et al., 2013). Plusieurs études se sont intéressées à son potentiel pour la vaccination. En effet, la présence d'anticorps neutralisants contre le complexe semble être un marqueur de protection contre l'infection *in vivo*. Lors d'une primo-infection par le HCMV durant la grossesse, une association a été décrite entre la présence de ces anticorps et une diminution de la transmission au fœtus (Lilleri et al., 2012) (Lilleri et al., 2013). Une étude récente suggère que le cobaye pourrait être un bon modèle pour tester les vaccins anti-CMV basés sur le complexe gH dans le cadre de l'infection congénitale (Coleman et al., 2016). Un vaccin basé sur le complexe gH a été testé récemment. Il inhibe l'entrée du virus dans les cellules épithéliales, endothéliales ainsi que les fibroblastes et permet de limiter la réplication virale chez les macaques vaccinés (Wussow et al., 2013). Une autre étude utilise le cochon d'inde comme modèle d'infection congénitale par le CMV infecté par un virus modifié non réplcatif (DISC). Dans ce virus mutant, la protéine de capside essentielle GP85 n'est pas exprimée.

Ce vaccin induit une réponse anticorps importante contre les antigènes cibles (gB, gH /gL/gO et gM /gN). Une réponse lymphocytaire T est également induite. L'infection congénitale est sensiblement réduite chez les animaux vaccinés (Choi et al., 2016).

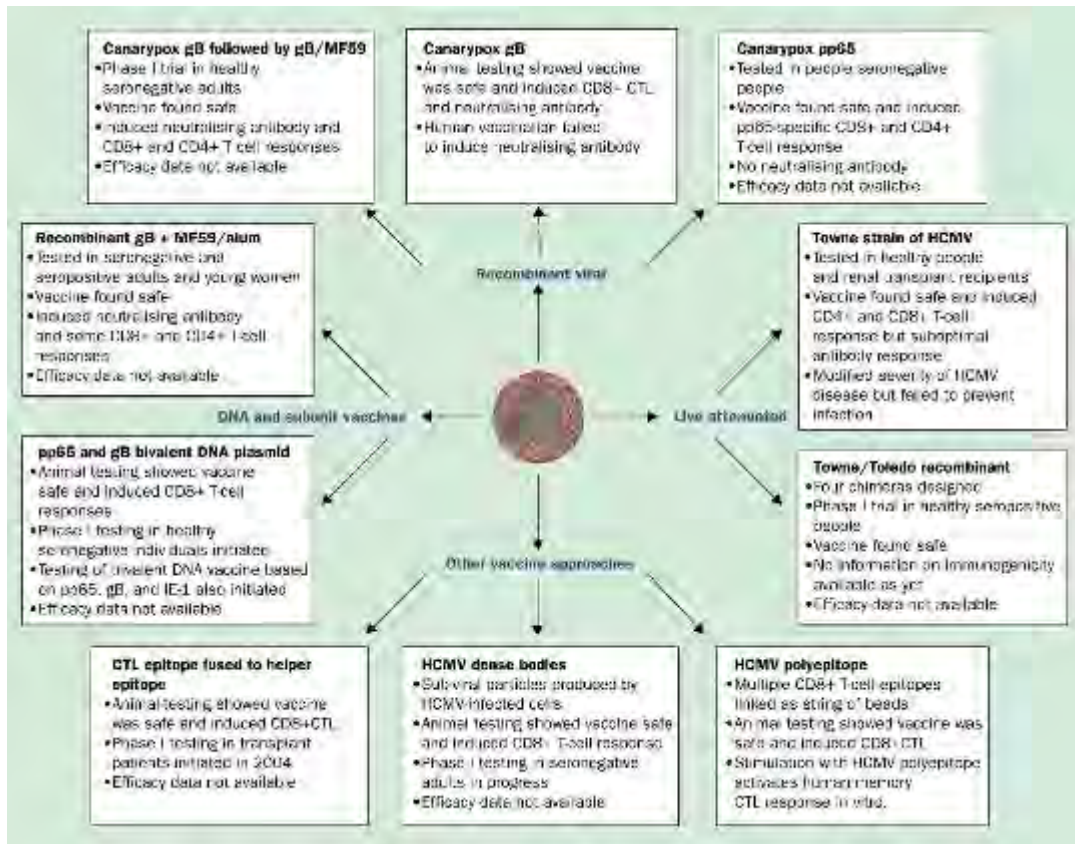


Fig. 7. Résumé des stratégies d'approches vaccinales testées contre le HCMV. (Gandhi and Khanna, 2004)

VI. Le cycle viral

Lors de la réplication, trois phases d'expression du génome viral ont lieu : la phase très précoce (IE pour immediate-early), précoce (E pour early) et tardive (L pour late). La durée du cycle viral en fonction du type cellulaire (48-72 h dans des fibroblastes contre 7 jours dans des cellules souches neurales). Le cycle viral est lytique dans les cellules permissives. En plus de son cycle productif, le HCMV établit une latence dans les cellules de la lignée myéloïde comme les monocytes et leurs précurseurs hématopoïétiques CD34⁺, ainsi que dans les cellules endothéliales. Le virus peut alors se réactiver lors de la différenciation de ces cellules ou sous l'effet d'autres facteurs.

A- Entrée du virus

Le HCMV a un spectre d'hôte restreint à une seule espèce, l'homme, mais un tropisme très large qui lui permet d'infecter un grand nombre de types cellulaires comme les fibroblastes,

les cellules épithéliales, les cellules endothéliales, les trophoblastes placentaires, les macrophages, les cellules dendritiques, les hépatocytes, les neutrophiles, les cellules musculaires lisses, les cellules souches neurales et les astrocytes (Luo et al., 2008).

L'entrée du virus nécessite une adhésion à la surface cellulaire via les heparan-sulfates (Compton et al., 1993). Cette adhésion non-spécifique joue un rôle crucial dans le recrutement des virions à la surface cellulaire et l'engagement d'autres récepteurs (Fig. 8).

Le virus a été décrit pour interagir avec un grand nombre de récepteurs. La protéine virale gB peut lier l'anexine II et induire ainsi la fusion des membranes phospholipidiques (Wright et al., 1995). CD13 a également été décrit pour être un récepteur du HCMV (Soderberg et al., 1993). Les anticorps bloquants anti-CD13 inhibent l'attachement et l'entrée du virus dans les cellules (Giugni et al., 1996). Mais beaucoup d'autres récepteurs ont été décrits : EGFR (Wang et al., 2003), DC-SIGN (Halary et al., 2002), plusieurs intégrines (McKeating et al., 1986) ... Le mécanisme d'entrée (fusion des membranes, endocytose ou macropinocytose-like (Haspot et al., 2012)) dépend du type cellulaire infecté. L'entrée du HCMV dans la cellule induit l'activation de voies de signalisation telles que les voies du calcium, l'activation de la phospholipase A2 ou l'augmentation de la libération d'acide arachidonique / linoléique et de ses métabolites (Fortunato et al., 2000).

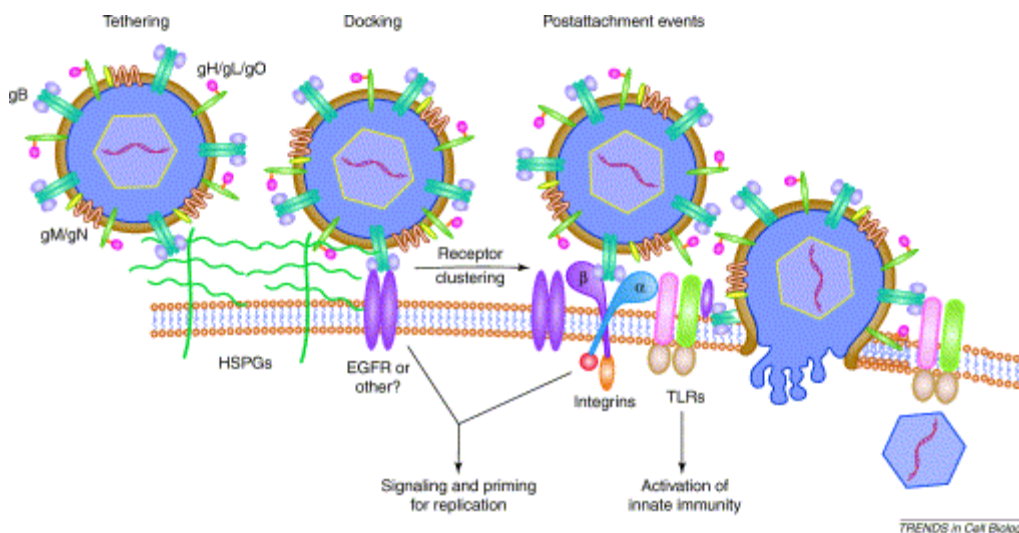


Fig. 8. Mécanisme d'entrée du HCMV par fusion membranaire. Les protéines gM/gN ou gB se lient de façon non spécifique aux heparan sulfate puis gB lie le récepteur cellulaire (EGFR ou autre). Des interactions entre les glycoprotéines virales, des intégrines et des TLR cellulaires permettent le rapprochement puis la fusion des enveloppes cellulaires et virales. La nucléocapside est libérée dans le cytoplasme. (Compton, 2004)

B- Le cycle productif

La nucléocapside est relarguée dans le cytoplasme. Elle est transportée jusqu'au noyau, grâce aux microtubules et au cytosquelette d'actine, où l'ADN viral est ensuite libéré (Dohner and Sodeik, 2005). Les gènes viraux sont alors exprimés de façon séquentielle : IE puis E puis L, jusqu'à la réalisation complète du cycle viral. Le génome est ensuite encapsidé et les virions néoformés relargués dans le milieu extracellulaire. Le virus peut également être disséminé par échange cellule à cellule via des connections cellulaires. Ce mode d'infection est d'ailleurs le plus répandu *in vivo*. Il permet au virus d'échapper aux anticorps neutralisants de l'organisme (Digel et al., 2006).

1. La phase très précoce (IE – Immediate Early)

Les transcrits IE sont produit 1 à 4 h après infection et s'accumulent majoritairement 8 h post-infection. Les produits des gènes IE sont nécessaires à la réplication virale.

Les protéines très précoces ont deux rôles : 1.elles sont impliquées dans la synthèse de l'ADN viral, le clivage et l'organisation du génome viral et l'assemblage des particules néoformées. 2. En outre, elles créent un environnement cellulaire et extracellulaire optimal pour l'expression des gènes viraux et la réplication. Les gènes IE codent majoritairement pour des activateurs transcriptionnels. Ils comprennent quatre clusters de gènes exprimés immédiatement après infection : UL36-UL37, UL122-123, TRS1-IRS1, US3). Chaque cluster est contrôlé par un promoteur distinct. UL122-123 code pour les protéines IE1 et IE2, son promoteur le Major Immediate Early Promoter (MIEP) a été le plus étudié. IE1 et IE2 jouent un rôle capital dans l'initiation et la maintenance de l'expression des gènes du HCMV lors du cycle lytique ou latent. Elles sont impliquées dans le blocage du cycle cellulaire de manière dépendante de p53. Les gènes UL36 et UL37 codent pour des protéines qui ont pour effet pour d'inhiber l'apoptose (vMIA – viral Mitochondrial Inhibitor of Apoptosis et vICA – viral Inhibitor of Caspase 8 - qui rentrent dans la mitochondrie) (Goldmacher et al., 1999). Les transcrits IE sont également responsables de l'échappement à la réponse immunitaire de l'hôte (Mocarski, 2002a). IRS1 et TRS1 codent pour des protéines capables de bloquer la protéine kinase R (PKR), un des mécanismes de défense cellulaire induit en réponse aux interférons (IFN) de type 1. US3 empêche l'expression du MHCI à la surface des cellules et bloque ainsi la présentation d'antigènes viraux (Wyrwicz and Rychlewski, 2008). Les protéines IE1/2 étant essentielles au cycle viral, plusieurs études se sont alors intéressées à la régulation de leur expression. Plusieurs

facteurs de transcription sont impliqués dans cette régulation. Le virus utilise également l'activité enzymatique de la cyclooxygénase 2 (COX2) (Fig. 9).

En effet, l'inhibition de COX2 entraîne une diminution importante de l'expression d'IE2 et de la production de nouveaux virions (Zhu et al., 2002).

Les métabolites de COX2 active PPAR γ , un facteur de transcription qui, en se fixant sur le MIEP, permet l'expression d'IE1/2 (Rauwel et al., 2010).

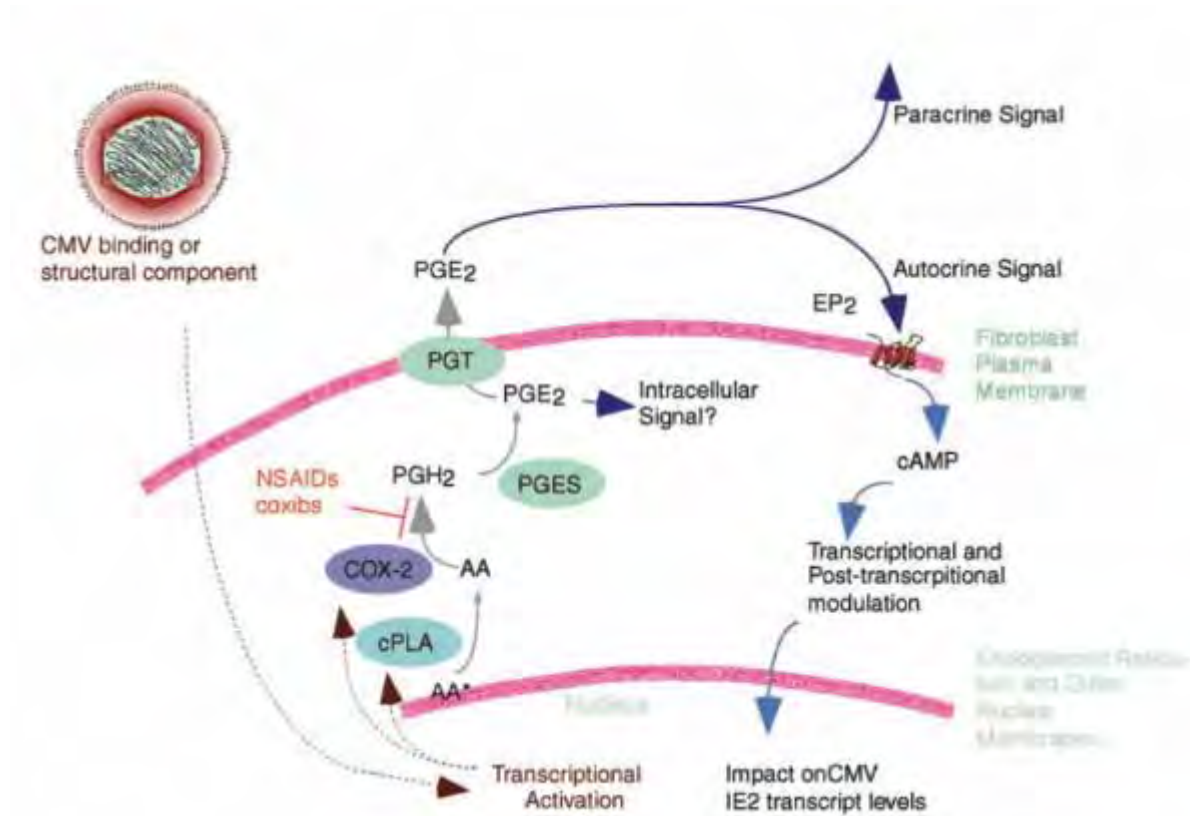


Fig. 9. L'infection par le HCMV induit la production de COX2 et de la phospholipase A2 (cPLA) qui vont, via PGE2, réguler l'expression d'IE2. (Mocarski, 2002b)

2. La phase précoce (E - Early)

L'expression des gènes E commence à 6 h et dure jusqu'à 18 à 24 h post-infection, précédant la synthèse de l'ADN viral. Il a été mis en évidence au moins 23 gènes nécessaires à la réplication, ainsi que d'autres ayant un rôle dans le contrôle de la cellule hôte. UL112-113 code pour quatre protéines impliquées dans l'initiation de la réplication de l'ADN viral. UL54 code pour l'ADN polymérase virale. Les gènes E codent également pour de nombreuses protéines du tégment comme pp65, pp71, pp150, ppUL48. Ces protéines ont un rôle important lors de l'entrée du virus ou lors de la maturation de la capsid. Pour permettre la réplication de l'ADN, le virus est capable d'induire l'entrée de la cellule en phase S en ciblant les CDK (Cyclin Dependent Kinase), les cyclines ainsi que p53. Les protéines du tégment pp71 et ppUL69

peuvent altérer la progression du cycle cellulaire, afin de créer l'environnement cellulaire adapté pour la réplication. Les gènes E codent également pour des enzymes de réparation et d'autres protéines non-structurales.

3. La phase tardive (L - Late)

Les gènes L commencent à être exprimés 24 h post-infection. Ils sont exprimés après la réplication de l'ADN viral et contribuent à l'assemblage et la morphogénèse du virion.

Une partie de l'expression des gènes L dépend de la transcription de l'ADN viral. Leurs rôles essentiels sont la formation et la maturation de la capsid, l'encapsidation de l'ADN, la maturation du virion et la sortie du virus de la cellule. Les cinq composants de la capsid sont très conservés chez les herpesvirus. MCP, TR11, TR12, SCP et PORT forment la procapsid. Les séquences *pac* présentes sur le génome viral sont reconnues et permettent l'encapsidation du génome. Certaines protéines du tégument contrôlent les deux stades d'enveloppement et de sortie du virion. Ce processus commence dans le noyau et se poursuit jusqu'à l'exocytose de la particule virale à la membrane plasmique (Fig. 10). L'enveloppement initial se déroule au niveau de la membrane interne du noyau. Le modèle admis classiquement est celui d'un dé-enveloppement par fusion avec la membrane nucléaire externe, la nucléocapsid étant alors libérée dans le cytoplasme. Elle subit un enveloppement terminal au niveau de l'ERGIC (ER-Golgi intermediate compartment) et les virions matures seront exportés par la voie exocytique. La moitié de ces particules sont libérées dans le milieu extracellulaire, tandis que l'autre moitié reste attachée à la membrane plasmique. Les nouveaux virions ont une demi-vie de 24 à 48 h. Il reste dans la cellule de nombreuses structures virales incomplètes non infectieuses, comme les corps denses (structures enveloppées défectives pour la réplication). La présence de ces corps denses dans le noyau le déforme et donne cette apparence caractéristique des cellules infectées, dite en « œil de chouette (Howley, 2007).

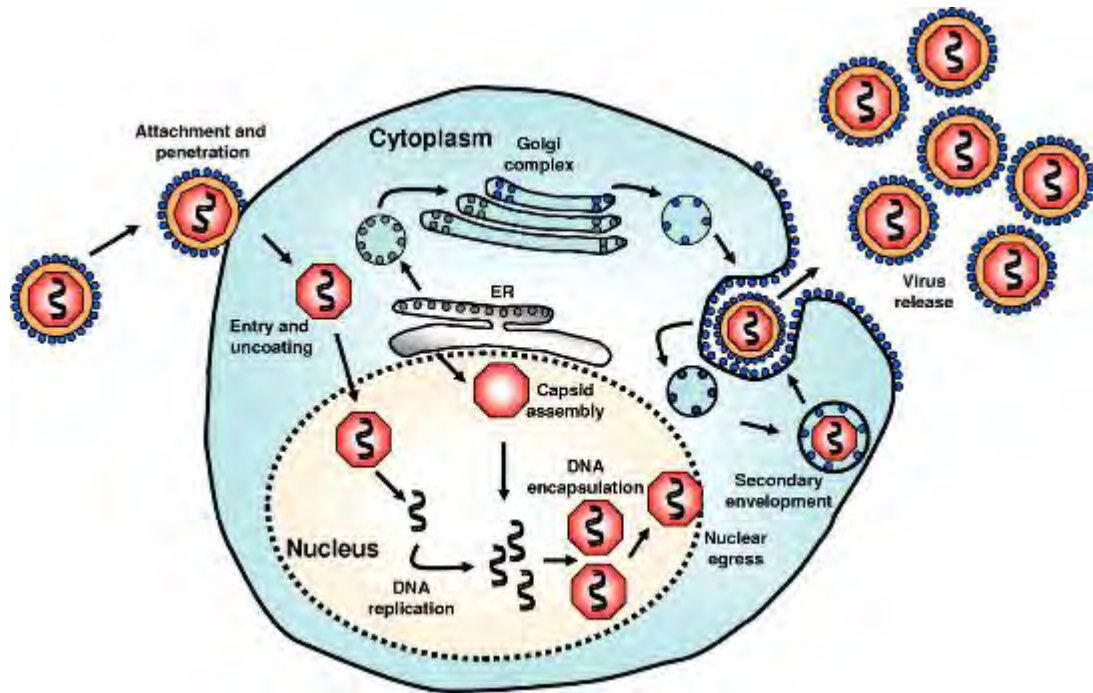


Fig. 10. Cycle viral lytique du CMV. La nucléocapside est libérée dans le cytoplasme et acheminée jusqu'au noyau. L'ADN viral est répliqué grâce à l'expression préalable d'IE1 et IE2. L'ADN viral est encapsidé lors de la phase tardive. Un enveloppement primaire a lieu au niveau de la membrane nucléaire puis un enveloppement secondaire a lieu au niveau du RE. Le virion néoformé est libéré par exocytose. (Crough and Khanna, 2009)

C- Le cycle latent et la réactivation

Comme tous les herpèsvirus, le CMV est capable d'établir une latence dans ses cellules cibles. Les mécanismes qui permettent le maintien en latence et la réactivation du virus ne sont pas tous bien compris. Des études montrent que les progéniteurs hématopoïétiques CD34⁺, les progéniteurs macrophage-granulocytes CD33⁺ sont les cellules cibles majeures pour la latence du CMV (E., 2007). Le virus rentre dans ces cellules, mais le cycle réplcatif est ensuite rapidement interrompu et il n'y a pas d'expression des gènes précoces et tardifs. L'ADN viral forme un épisome, seuls sont alors produits les transcrits dit « de latence ». Un homologue viral de l'IL-10 cellulaire (vIL-10) est exprimé, qui permet au virus d'échapper à la réponse immunitaire cellulaire en créant un microenvironnement immunosuppresseur. D'autres transcrits de latence ont été identifiés, comme UL81 et LUNA, mais leurs fonctions ne sont pas bien connues. Le gène UL133-UL138, qui code notamment pour les protéines pUL133 et pUL138, est nécessaire au maintien de la latence dans les cellules CD34⁺ *in vitro* (Petrucci et al., 2012). L'expression des gènes viraux est étroitement régulée durant la latence, en particulier au niveau du promoteur MIEP, qui contrôle l'expression des gènes majeurs IE. Le MIEP est en particulier la cible de répresseurs cellulaires (MBF, YY1, MRF et Gfi-1) qui sont tous préférentiellement exprimés dans les cellules indifférenciées.

Les changements d'expression des gènes viraux pourraient être liés à des réarrangements de la structure de la chromatine virale entre le cycle lytique et latent. Lors de la latence, des histones s'associent à l'ADN viral, mimant la structure de la chromatine cellulaire. Des résultats montrent que la structure de la chromatine autour du MIEP change avec la différenciation cellulaire (Fig. 11). Ce changement, médié par les HDAC (Histone Déacétylase), pourrait jouer un rôle dans la balance entre latence et réactivation. (Murphy et al., 2002). L'analyse du MIEP isolé à partir de génomes viraux latents montre qu'il est associé majoritairement à des histones méthylés et à la protéine répressive HP-1.

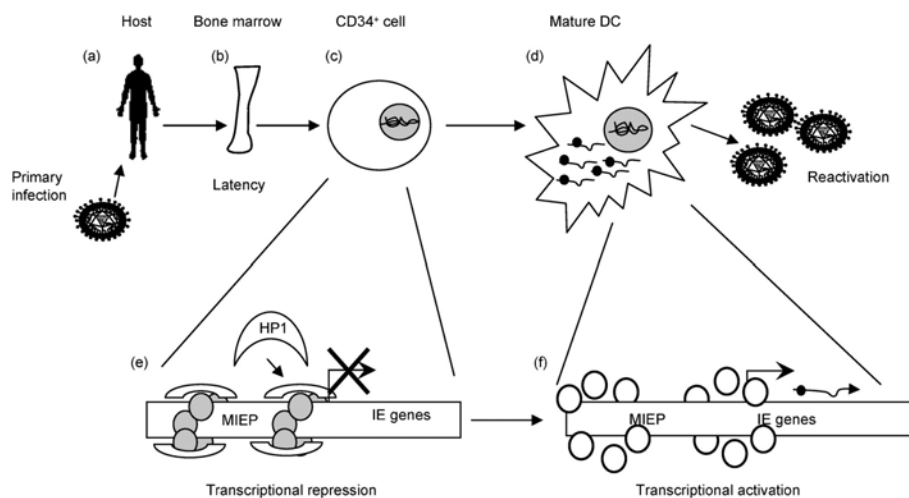


Fig. 11. Régulation de la latence du HCMV par remodelage du MIEP. Suite à une primo-infection (a), le HCMV établit une infection latente dans les cellules hématopoïétiques CD34+ (b). Le génome viral persiste dans les cellules en l'absence d'expression des gènes lytiques (c) grâce à l'action de répresseurs transcriptionnels cellulaires (notamment HP1 et KAP1) qui lient le promoteur MIEP. Ces répresseurs recrutent des enzymes qui induisent la modification des histones liées au promoteur MIEP, induisant la répression de la transcription des gènes IE (e). Cependant, si les cellules CD34+ se différencient en cellules dendritiques, l'expression des gènes lytiques se réactive et permet la production de nouveaux virions infectieux (d). Cette réactivation est liée à un remodelage de la chromatine du MIEP qui induit l'activation de la transcription des gènes IE (f). (Sinclair and Sissons, 2006)

L'inhibition du cycle lytique est dépendante du cycle cellulaire. En effet, la répression de l'expression des gènes viraux a lieu durant la phase S/G2 et est due à l'activité des CDK.

La réactivation du virus peut provenir d'une immunosuppression ou d'une immunodéficience. La balance entre latence et réactivation est dépendante du type cellulaire ou de facteurs spécifiques de la différenciation cellulaire qui contrôlent l'expression des gènes viraux et la réplication. Une association forte a été décrite entre différenciation cellulaire et réactivation. Ainsi, la différenciation des progéniteurs en monocytes ou en cellules dendritiques peut conduire à la réactivation virale et la libération de nouveaux virions infectieux (Sinclair and Sissons, 2006).

VII. La famille des Peroxisome Proliferator Activated Receptors gamma (PPAR γ)

A- Généralités sur les PPAR

Les PPAR sont des facteurs de transcription qui appartiennent à la superfamille des récepteurs nucléaires. Il existe 3 isoformes de PPAR, produits par 3 gènes différents et désignés PPAR α , PPAR β et PPAR γ . Chaque isoforme présente une distribution tissulaire et une activité spécifique. Les PPAR sont activés par la liaison à leur ligand. Leur rôle principal consiste à réguler l'expression de gènes possédant un ou plusieurs éléments de réponse aux PPAR dans leurs promoteurs. Chaque isoforme est activé par des ligands spécifiques, qui peuvent être : des acides gras (in)saturés, des stéroïdes, des hormones thyroïdiennes ou des vitamines (Chawla et al., 2001). On peut aussi ajouter les éicosanoïdes dérivés du métabolisme de l'acide arachidonique (notamment les leucotriènes), ou les prostaglandines issues de la voie des COX.

B- Activation de PPAR γ

La prostaglandine 15d-PGJ₂ a été largement décrite comme étant un ligand activateur physiologique très efficace *in vitro* de PPAR γ , de même que les prostaglandines A₂ et D₂. Le 15d-PGJ₂ est issu du métabolisme de l'acide arachidonique via les enzymes COX (Fig. 12).

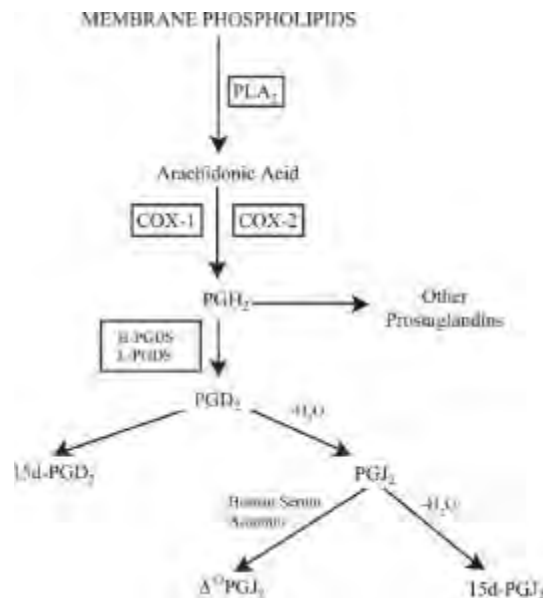


Fig. 12. Synthèse du 15d-PGJ₂, ligand activateur de PPAR γ . La phospholipase A₂ catalyse les phospholipides membranaires en acide arachidonique. La catalyse de cet acide arachidonique par les COX 1 et 2 permet la synthèse des prostaglandines notamment du 15d-PGJ₂, ligand de PPAR γ (Scher and Pillinger, 2005).

Plusieurs métabolites oxydés de l'acide linoléique sont également des ligands de PPAR γ comme le 9-et le 13-hydroxy-octadecadienoic acid (HODE) (Nagy et al., 1998).

Il existe aussi des ligands synthétiques de PPAR γ : les thiazolidinédiones (TZD), qui comprennent notamment la rosiglitazone, la troglitazone ou la pioglitazone. Ces molécules sont d'ailleurs utilisées comme traitement du diabète de type 2 (Nagy et al., 1998; Tontonoz et al., 1998) (Nagy et al., 1998; Tontonoz et al., 1998).

C- Structure et rôles transcriptionnels de PPAR γ

1. Structure

Il existe 2 isoformes de PPAR γ , PPAR γ 1 et PPAR γ 2, produits par épissage alternatif. PPAR γ 2 contient 28 acides aminés de plus à son extrémité NH2 terminale (Fig. 13) et est exprimé préférentiellement dans les adipocytes et le foie. PPAR γ 1 est prédominant dans l'organisme. Son expression est ubiquitaire. Les domaines fonctionnels des PPAR sont communs aux autres récepteurs stéroïdiens.



Fig. 13. Structure fonctionnelle de la protéine PPAR γ . La section hachurée correspond aux 28 acides aminés spécifiques de PPAR γ 2. AF1 est un domaine d'activation ligand indépendant, DBD (DNA Binding Domain) est le domaine de liaison à l'ADN et LBD (Ligand Binding Domain) le domaine de fixation au ligand. (Heikkinen et al., 2007)

2. Rôle trans-activateur

La liaison de PPAR γ à son ligand est régulée par une communication intramoléculaire entre le domaine LBD (Ligand Binding Domain) et le domaine NH2 terminal (Vamecq and Latruffe, 1999). La liaison à son ligand active PPAR γ , qui transloque dans le noyau cellulaire. Il va alors s'hétérodimériser avec le récepteur RXR (Retinoic X Receptor) lui-même couplé à son ligand, l'acide rétinoïque. L'hétérodimère PPAR γ /RXR se fixe sur les éléments de réponse au niveau des promoteurs des gènes cibles pour activer la transcription de ceux-ci (Fig. 14). Ces éléments de réponse se nomment PPRE (PPAR Response Element) et sont constitués de 2 séquences hexanucléotidiques de même sens séparées par un nucléotide aléatoire (AGGTCA X AGGTCA) appelées motif DR1. Il existe également des séquences dans lesquelles plusieurs nucléotides aléatoires (2 à 6) séparent les deux séquences en tandem. Ces motifs sont nommés de DR2 à DR6. Le niveau de conservation des séquences PPRE n'est pas constant au sein du génome humain. La séquence en 5' joue un rôle important dans l'intensité de la transcription (Palmer et al., 1995).

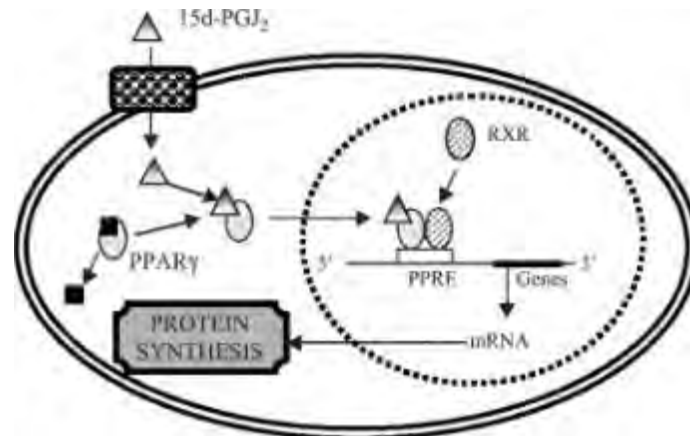


Fig. 14. Activation transcriptionnelle de PPAR γ , ici par le 15d-PGJ₂. (Scher and Pillinger, 2005)

Des protéines co-activatrices sont recrutées pour permettre la transcription. Les protéines SRC et CBP/p300 décondensent la chromatine par leur activité histone acétylase. Les protéines DRIP/TRAP interagissent avec la machinerie de transcription. D'autres protéines recrutées ont des fonctions encore mal définies, comme PGC1 (PPAR Gamma Co-activator 1), qui est impliqué dans l'épissage (Kornblihtt, 2005).

3. Rôle trans-répresseur

En plus de son rôle trans-activateur, PPAR γ peut aussi agir comme trans-répresseur. Dans ce cas, l'enzyme PIAS1 induit la liaison covalente de la protéine SUMO1 à PPAR γ . PPAR γ sumoylé interagit alors directement avec les protéines nCOR et HDAC3 en inhibant leur ubiquitinylation et leur dégradation par le protéasome. Le complexe répresseur ne peut alors plus être décroché du promoteur et les complexes activateurs ne peuvent plus se fixer pour transcrire le gène (Fig. 15). PPAR γ peut réprimer l'expression de gènes inflammatoires comme le Tumor Necrosis Factor (TNF), l'interleukine 1 β , l'interleukine 6, la matrix metalloprotéase 9 et le récepteur de scavenger A (Bailey and Ghosh, 2005).

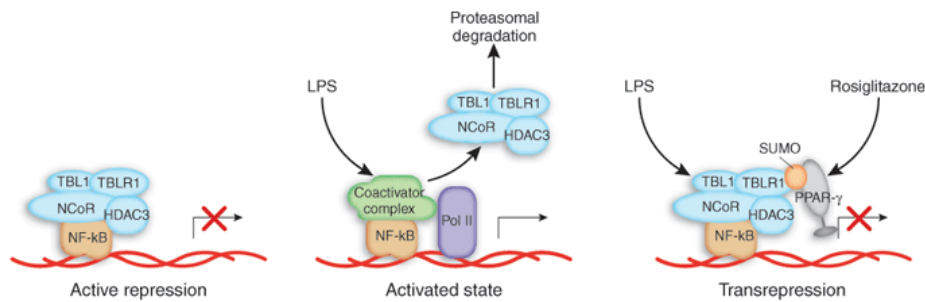


Fig. 15. Rôle trans-réresseur de PPAR γ . PPAR γ empêche la dégradation du complexe répresseur qui reste fixé sur le promoteur. Le gène ne peut plus être transcrit. (Bailey and Ghosh, 2005)

D- Rôles physiologiques

PPAR γ est impliqué dans de nombreuses voies métaboliques et a donc de nombreux rôles biologiques.

Il participe à l'adipogénèse et régule le métabolisme lipidique dans les adipocytes matures. Son activation conduit à une accumulation des lipides dans les adipocytes et les autres tissus. Cette stimulation des adipocytes permet de diminuer la résistance à l'effet de l'insuline. L'ensemble de ces mécanismes sont utilisés en thérapie dans le traitement du diabète de type II (Lehrke and Lazar, 2005).

L'activation de PPAR γ induit une vasoprotection de l'organisme qui permet une réduction de l'athérosclérose (Dormandy et al., 2005).

PPAR γ a un rôle important dans le fonctionnement du système immunitaire, en particulier dans la production de cytokines (Fig. 16). Son effet est connu pour être anti-inflammatoire.

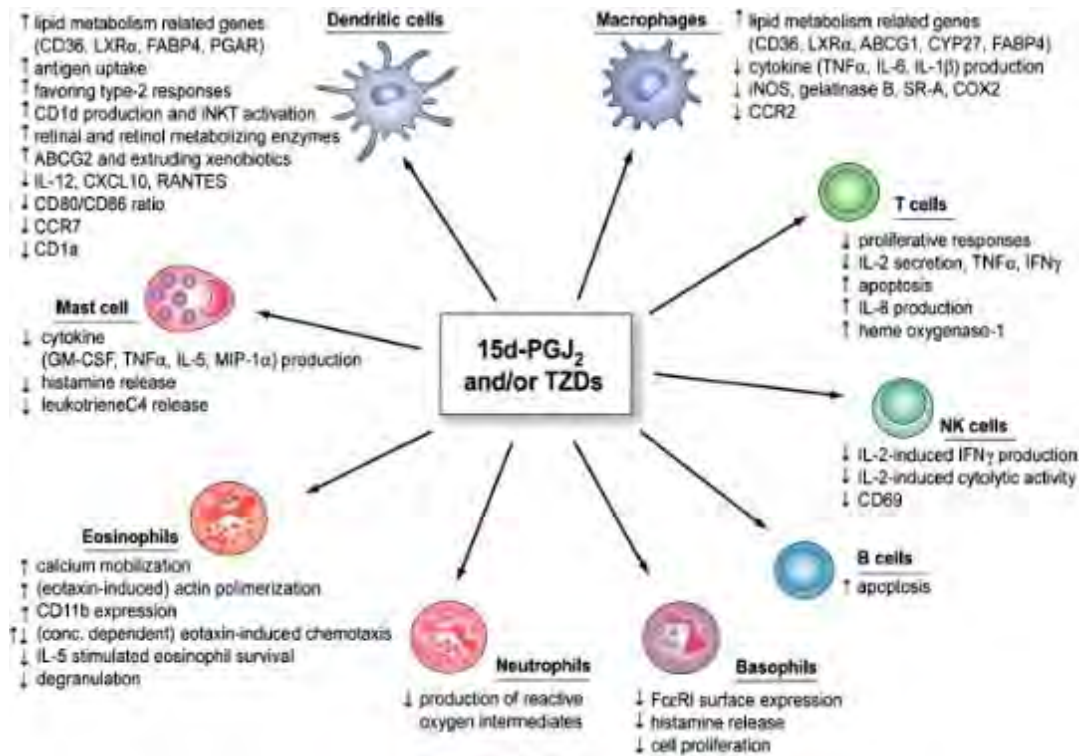


Fig. 16. Effets de l'activation de PPAR γ par son agoniste physiologique, le 15d-PGJ₂ ou pharmacologiques, les thiazolidinédiones (TZD), sur les différentes cellules du système immunitaire. (Szeles et al., 2007)

L'activation de PPAR γ par les TZD a un effet neuroprotecteur du CNS, via l'activation microgliale et la sécrétion de cytokines et chimiokines anti-inflammatoires. L'expression de PPAR γ induit une neuroprotection importante chez l'animal dans le cas d'ischémies ou de lésions de la moelle épinière. En effet, l'activation de PPAR γ diminue la mort cellulaire dans les cas d'ischémie en diminuant le stress oxydatif et la production de ROS. Chez l'animal, il a été montré que le traitement par le TZD promeut la mise en place de mécanismes antioxydants. Cet effet peut aussi être observé en sur-activant la voie COX qui permet la production de 15d-PGJ₂ (Kapadia et al., 2008). L'activation de PPAR γ et l'effet neuroprotecteur associé ont un effet bénéfique sur plusieurs pathologies du CNS. Les agonistes de PPAR γ sont efficaces chez l'animal pour le traitement de la maladie d'Alzheimer, la sclérose en plaques, la maladie de Parkinson ou la sclérose latérale amyotrophique (Sundararajan et al., 2006). Au niveau du CNS, PPAR γ permet la régulation de gènes impliqués dans la neurotransmission et pourrait jouer un rôle dans les processus de vieillissement, de neurodégénérescence, de langage ou de mémorisation (Moreno et al., 2004).

E- Rôles dans la grossesse

1. Dans le placenta

PPAR γ est exprimé dans le placenta dès sa formation. Il est nécessaire à la placentation et le KO de PPAR $\gamma^{-/-}$ est donc létal *in utero* à cause d'un défaut précoce de placentation. PPAR γ régule en effet l'invasion et la migration trophoblastique ainsi que la formation du syncytiotrophoblaste. Il est aussi impliqué dans la différenciation des cellules placentaires (Fig. 17).

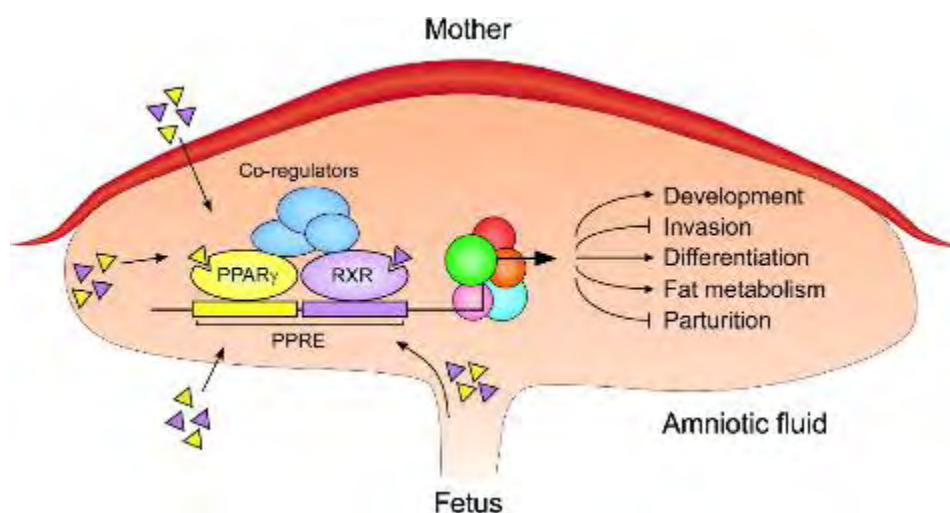


Fig. 17. La régulation transcriptionnelle dépendante de PPAR γ est capitale pour de nombreux aspects du développement placentaire. (Schaiff et al., 2006)

2. Dans le cerveau

PPAR γ est impliqué dans le développement cérébral. Un niveau d'expression important a été décrit durant le développement du cerveau chez la souris et l'homme. Dans le cerveau adulte, le niveau d'expression de PPAR γ est cependant faible. Les embryons de souris KO PPAR $\gamma^{-/-}$ présentent d'importantes anomalies cérébrales (Wada et al., 2006). Des études montrent que PPAR γ régule la prolifération et la différenciation des NSC murines via la surexpression de l'EGF et l'activation de la voie ERK. L'activation de PPAR γ chez la souris induit une stimulation de la prolifération des NSC et une inhibition de leur différenciation en neurones. Cette inhibition de la différenciation est associée à une activation de STAT3 par phosphorylation (Wada et al., 2006). L'activation de PPAR γ par le 15d-PGJ2 induit la prolifération des cellules progénitrices neurales (NPC) murines.

PPAR γ peut réguler la prolifération, la migration et la différenciation des cellules souches neurales (NSC) via les voies de signalisation Wnt, STAT3 et NF κ B (Cimini and Ceru, 2008). L'activation de PPAR γ par les TZD augmente la prolifération, la migration et la différenciation des NSC de rat *in vitro* et *in vivo* (Morales-Garcia et al., 2011).

Plusieurs études montrent le rôle capital de PPAR γ dans la différenciation lors du développement embryonnaire du rat (Braissant and Wahli, 1998).

Dans les cellules placentaires humaines, l'infection par le HCMV induit une activation de l'enzyme COX2 qui métabolise l'acide arachidonique. Les prostaglandines produites (PDG2, PGJ2) sont des ligands activateurs de PPAR γ (Scher and Pillinger, 2005). L'infection par le HCMV augmente ainsi l'activité de PPAR γ dans le placenta. PPAR γ activé va se fixer sur les séquences PPRE du promoteur viral MIEP et permet la transcription des gènes IE. Cette fixation est importante pour la production virale, car l'inhibition de PPAR γ induit une diminution drastique du nombre de nouveaux virions. L'activation massive de PPAR γ conduit à une inhibition quasi totale de la migration et de l'invasion des cellules cytotrophoblastiques (Rauwel et al., 2010).

Comme nous l'avons vu, PPAR γ joue donc un rôle crucial à la fois lors de l'infection par le HCMV et dans le développement cérébral. Comme les infections congénitales par le HCMV constituent la première cause d'anomalie cérébrale du nouveau-né, nous nous sommes logiquement intéressés à l'effet potentiel de PPAR γ dans le cerveau embryonnaire après infection.

LES CELLULES SOUCHES NEURALES

I. Le développement cérébral

A- Généralités

Un des premiers stades du développement embryonnaire est la formation des trois couches germinatives : le mésoderme, l'endoderme et l'ectoderme. Le CNS dérive de l'ectoderme. Au cours du développement, l'ectoderme dorsal donne la plaque neurale qui plus tard deviendra le tube neural. Avant la neurogénèse, la plaque neurale et le tube neural se composent d'une seule couche de cellules neuro-épithéliales, qui forment le neuro-épithélium. Le neuro-épithélium se transforme progressivement en un tissu composé de plusieurs couches de cellules. La couche cellulaire qui tapisse les ventricules est appelée zone ventriculaire (Gotz and Huttner, 2005). Le néocortex est une structure complexe très élaborée et remarquablement conservée au cours du développement des espèces. Il se compose de plusieurs couches, de circuits intrinsèques et de connections longues distance (Dugas-Ford and Ragsdale, 2015). Cette structure complexe est mise en place séquentiellement. Le développement cérébral suit schématiquement trois grandes étapes (Fig. 18): 1. Une étape de prolifération des cellules souches et progéniteurs. Deux critères permettent de définir les cellules souches : l'auto-renouvellement, quel que soit le nombre de divisions et la multipotence, c'est-à-dire la capacité à donner plusieurs types de cellules différenciées (Gotz and Huttner, 2005). Les cellules souches neurales (NSC) sont capables de se différencier en cellules de la lignée neurale qui sont les neurones, astrocytes et oligodendrocytes. Ces deux types cellulaires (nerveux et glial) constituent les composants du système nerveux central. Elles prolifèrent alors dans des « niches » restrictives dans l'espace. 2. Une étape de migration le long de la glie radiaire. La glie radiaire dérive du neuro-épithélium du cerveau. Son architecture particulière sert de support aux progéniteurs et aux neurones en migration. Cette étape est capitale au bon positionnement des cellules et à la différenciation cellulaire qui s'ensuit. Différents programmes d'expression de facteurs de transcription contrôlent le déplacement des NSC dans le temps et l'espace. La localisation des NSC permettra leur spécification régionale sous l'influence de facteurs intrinsèques et de facteurs environnementaux. 3. Une étape d'organisation corticale et de différenciation des progéniteurs afin de former les six couches du cortex. La neurogénèse (différenciation en neurone) précède la gliogénèse (différenciation en astrocyte ou oligodendrocyte) lors du neuro-développement. Les NSC des différentes couches corticales se différencient de façon séquentielle en neurones. Aujourd'hui encore, il existe une controverse pour savoir si les différents types cellulaires nerveux et gliaux dérivent de précurseurs embryonnaires différents programmés au départ qui coexisteraient dans le cerveau embryonnaire, ou s'il existe des cellules progénitrices multipotentes intrinsèquement capable de générer une grande diversité de types cellulaires

neuraux et gliaux. Cette dernière hypothèse est la plus admise actuellement depuis la démonstration que des NSC peuvent se différencier à la fois en neurones et en astrocytes (Gaspard et al., 2008). Pendant longtemps, les chercheurs ont pensé que la différenciation en neurones était due aux facteurs environnementaux. Cependant, des études récentes montrent que les caractéristiques neuronales, en particulier leur morphologie unique, sont déterminées par des facteurs cellulaires intrinsèques (Kriegstein and Alvarez-Buylla, 2009).

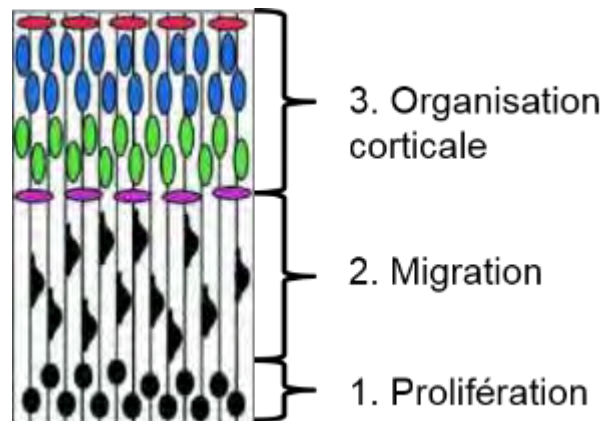
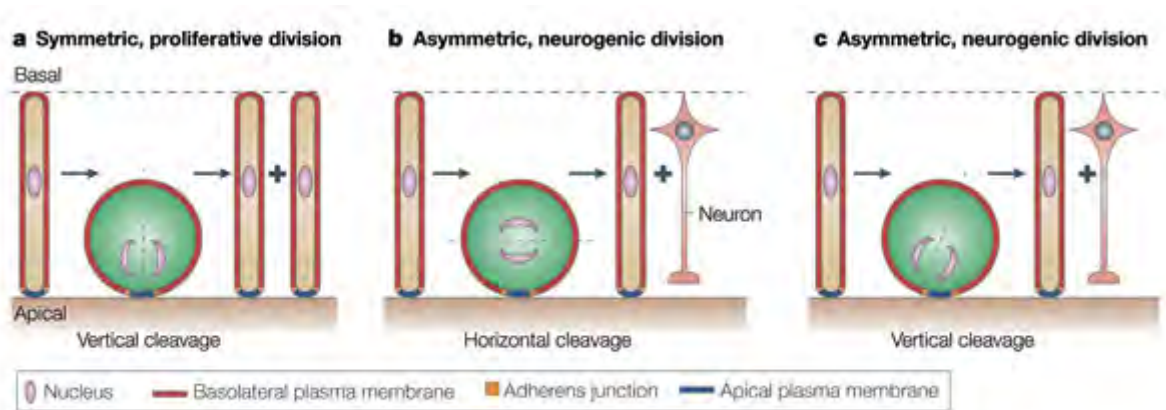


Fig. 18. Etapes schématiques du développement cérébral. Les NSC prolifèrent dans la VZ, migrent le long de la glie radiaire et se différencient et s'organisent pour former les différentes couches cérébrales sous la surface piale (ici en rouge). Adapté depuis (Lambert de Rouvroit and Goffinet, 2001).

B- Prolifération des cellules souches et progéniteurs neuraux

Les NSC se situent dans les zones ventriculaires (VZ), elles peuvent s'auto-renouveler ou sortir du cycle de division cellulaire pour se différencier. La prolifération des progéniteurs neuronaux lors des stades précoces du développement cérébral est nécessaire pour la création d'un pool de progéniteurs à la surface ventriculaire. Les cellules neuro-épithéliales possèdent une polarité basale-apicale capitale pour leur division, qui peut être symétrique ou asymétrique. La division symétrique permet une répartition égale du matériel entre les deux cellules filles. Celles-ci sont donc identiques, à la fois entre elles et par rapport à la cellule mère. Ce type de division permet la prolifération des NSC. La division asymétrique induit une répartition inégale du matériel cellulaire entre les cellules filles. Elles seront donc différentes entre elles et peuvent être différentes de la cellule mère (Fig. 19).

Ce type de division est responsable de la différenciation en neurones. Le fait que la division soit symétrique ou asymétrique dépend de l'axe de division (Gotz and Huttner, 2005).



Copyright © 2005 Nature Publishing Group
Nature Reviews | Molecular Cell Biology

Fig. 19. Divisions symétriques et asymétriques dans les cellules neuro-épithéliales et les cellules de la glie radiaire. Le schéma résume les relations entre la polarité basale-apicale, l'axe de division et les divisions symétriques et asymétriques. A. Un clivage vertical induit une division symétrique proliférative. B et C. Un clivage horizontal ou un clivage vertical peuvent induire une division asymétrique. (Gotz and Huttner, 2005)

La multipotence et la capacité d'auto-renouvellement sont permises par l'expression par les NSC des filaments de nestine, de la protéine RNA-binding Musashi 1 (MSI1) et des facteurs de transcription SoxB1. Ces facteurs ont un rôle capital dans la maintenance d'un stock de NSC (Oikari et al., 2015). La nestine est un filament intermédiaire de type IV identifié en 1985 (Hockfield and McKay, 1985) (Fig. 20). Elle est exprimée par les cellules souches du système nerveux central au niveau du tube neural (Chang and Goldman, 2004). La régulation transcriptionnelle du gène est unique. La région en amont du premier intron ne contient aucun élément régulateur. L'expression du gène *nestine* est régulée indépendamment par plusieurs éléments enhancers selon le temps et l'espace, et contenus dans le premier et deuxième intron. Le second intron du gène contient un enhancer spécifique du CNS (Wiese et al., 2004) (Jin et al., 2009). Au cours de la différenciation neurale, la nestine est sous-réglée et remplacée par des neurofilaments. Cette protéine est largement utilisée comme marqueur de NSC et progéniteurs neuraux (Lendahl et al., 1990) (Conti et al., 2005) (Pollard et al., 2006).

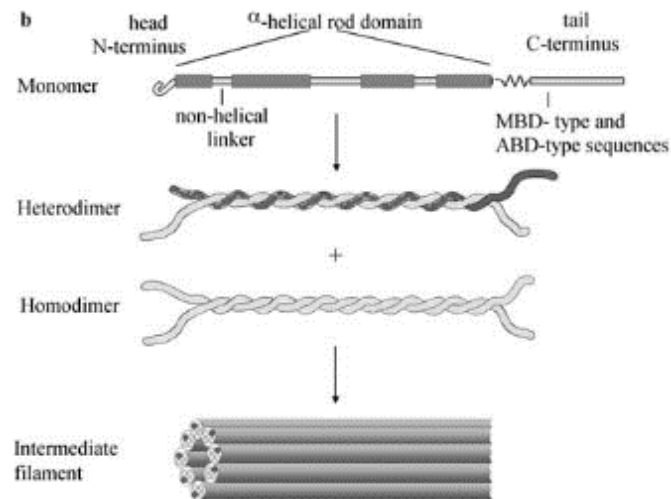


Fig. 20. Structure de la protéine Nestine. La nestine (noir) forme des hétérodimères avec la vimentine (blanc), qui s'assemble également en homodimère. Les filaments intermédiaires sont formés par l'assemblage des hétérodimères et homodimères. La nestine est localisée en périphérie. (Wiese et al., 2004)

MSI1 est une protéine très conservée au cours du développement des espèces. Elle est exprimée par les cellules souches fœtales et adultes et a un rôle essentiel dans la régulation de la division asymétrique. Elle est importante pour l'auto-renouvellement et la prolifération des cellules souches (Okano et al., 2005).

Les gènes *Sox* codent pour une famille de facteurs de transcription qui possèdent une HMG-type box. 26 gènes différents ont été identifiés. Les membres de la famille *Sox* sont très conservés chez les espèces vertébrées. Les gènes *SoxB* sont divisés en deux groupes : *SoxB1* qui comprend les gènes *Sox1-3* et *SoxB2* qui comprend les gènes *Sox14* et *Sox21*. Les protéines *Sox* peuvent activer (*SoxB1*) ou réprimer (*SoxB2*) leurs gènes cibles via des interactions avec d'autres facteurs. La balance entre l'expression entre *SoxB1* et *SoxB2* (en particulier *Sox21*) permet le maintien à l'état souche ou au contraire l'engagement dans la différenciation neuronale. En effet, les facteurs *SoxB1* induisent un blocage de l'engagement dans la lignée neuronale. Ils inhibent la neurogénèse *in vivo* et permettent le maintien de l'état indifférencié des NSC. *Sox2* est capital pour le développement du CNS. Le KO *Sox2*^{-/-} est léthal. *Sox2* est connu pour son rôle dans la multipotence et la reprogrammation des cellules. *Sox2* est exprimé dans les progéniteurs et NSC puis devient sous-régulé à la fin de leur cycle cellulaire, juste avant la différenciation. Sa présence est nécessaire pour garder les propriétés souches (Karnavas et al., 2013). Les facteurs *SoxB1* ne maintiennent pas l'état indifférencié des NSC en empêchant l'expression des protéines pro-neurales mais en entravant les capacités de ces protéines à induire la signalisation en aval qui conduit à la différenciation neuronale.

C- Migration des cellules souches neurales (NSC)

Les neurones, comme les autres cellules, migrent schématiquement selon trois étapes :

1. Une extension de la « leading edge ». Cette étape est précédée par la formation de lamellipodes et de filopodes qui explorent le microenvironnement.
2. La migration cellulaire nécessite une migration du noyau le long de l'axe de migration. Cette étape est connue sous le nom de nucléokinèse. Ce déplacement du noyau est permis par un réarrangement du cytosquelette de MT. Plusieurs protéines sont nécessaires à ce mécanisme. La reelin favorise la dynamique des MT à l'origine de la nucléokinèse. LIS1 régule la position des centrosomes et permet la translocation nucléaire. DCX permet de stabiliser les MT en maintenant l'arrangement correct des 13 protofilaments de MT. Ces protéines seront détaillées dans le chapitre suivant.
3. La rétractation d'une partie de la cellule de manière à finir le déplacement. Contrairement aux autres cellules, les neurones forment des motifs architecturaux très précis à la fin de la migration, qui pourraient être considérés comme une 4^{ème} étape.

La migration neurale commence de la 8^e à la 20^e semaine de gestation et continue après la naissance. Elle comporte de nombreux stades coordonnés entre eux. Avant et pendant les premières étapes de la migration, il se produit une importante prolifération des progéniteurs dans la zone sous-épendymaire. Au même moment, la glie de la zone sous-épendymaire envoie de longs processus cellulaires perpendiculairement à la surface : ce sont les cellules gliales radiales. Après la neurogénèse, les cellules neuro-épithéliales vont se transformer en un type cellulaire distinct, les cellules de la glie radiale. Ce sont des progéniteurs plus restreints dans le lignage que les cellules neuro-épithéliales. En conséquence, une partie des neurones du cerveau dérivent de façon directe ou indirecte des cellules de la glie radiale (Fig. 21). Ces cellules conservent leurs propriétés neuro-épithéliales. Elles expriment les marqueurs neuro-épithéliaux (nestine) et conservent une polarité apico-basale avec une localisation apicale des centrosomes. Cependant, à la différence des cellules neuro-épithéliales, elles expriment également des propriétés astrocytaires comme les marqueurs spécifiques : GLAST, S100b, GFAP. Ces caractéristiques apparaissent chez les cellules de la zone ventriculaires durant la neurogénèse (Gotz and Huttner, 2005).

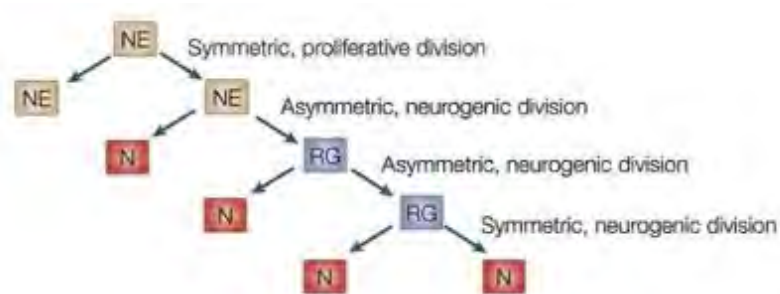


Fig. 21. Arbre des lignages de la neurogenèse présentant de façon simplifiée les relations entre les cellules neuro-épithéliales (NE), les cellules de la glie radiaires (RG) et les neurones. (Gotz and Huttner, 2005)

Les neurones immatures vont alors migrer le long de la glie radiaire. Le néocortex est constitué de six couches de neurones avec des fonctions et des morphologies distinctes. La formation de ces couches neuronales implique une migration radiale et tangentielle des neurones jusqu'à leurs positions finales (Fig. 22). La migration radiale signifie un mouvement des neurones de l'intérieur vers l'extérieur de la surface cérébrale. La surface interne du cerveau est la ligne des ventricules, la surface externe est la ligne de la pie-mère (membrane qui couvre le cerveau sous le crâne) ou surface piaie. La migration tangentielle signifie un mouvement neuronal parallèle aux surfaces interne et externe du cerveau.

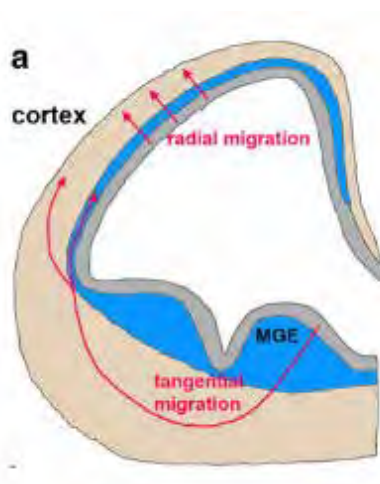


Fig. 22. Section coronale dans le cortex cérébral en développement permettant d'illustrer les migrations radiale et tangentielle. MGE : Eminence Ganglionnaire Médiale. (Liu, 2011)

La migration radiale commence à 8 semaines de gestation. Les NSC sont alors organisées en une couche cellulaire proliférative, la VZ. Entre 10 et 14 semaines de gestation, trois vagues successives de neurones immatures vont migrer afin de fournir la majorité des neurones du cortex mature. La première vague quitte la VZ et se déplace selon un mouvement radial jusqu'à la surface piaie (PS) du cerveau. La couche neuronale ainsi formée se nomme la pré-plaque (PP).

Une seconde vague de neurones migre ensuite radialement depuis la zone intermédiaire (IZ) et sépare la pré-plaque en zone marginale (MZ) et plaque profonde (subplate- SP). Pour cela, cette seconde vague de migration forme une couche neuronale entre la MZ et la SP : la plaque corticale (CP). Plusieurs vagues de neurones immatures quittent la VZ en plusieurs phases, migrent radialement, traversent la SP et viennent ajouter séquentiellement des couches neuronales à la CP. Une fois la CP correctement établie, la SP dégénère et laisse place aux six couches neuronales qui persistent à l'âge adulte (Gupta et al., 2002) (Fig. 23).

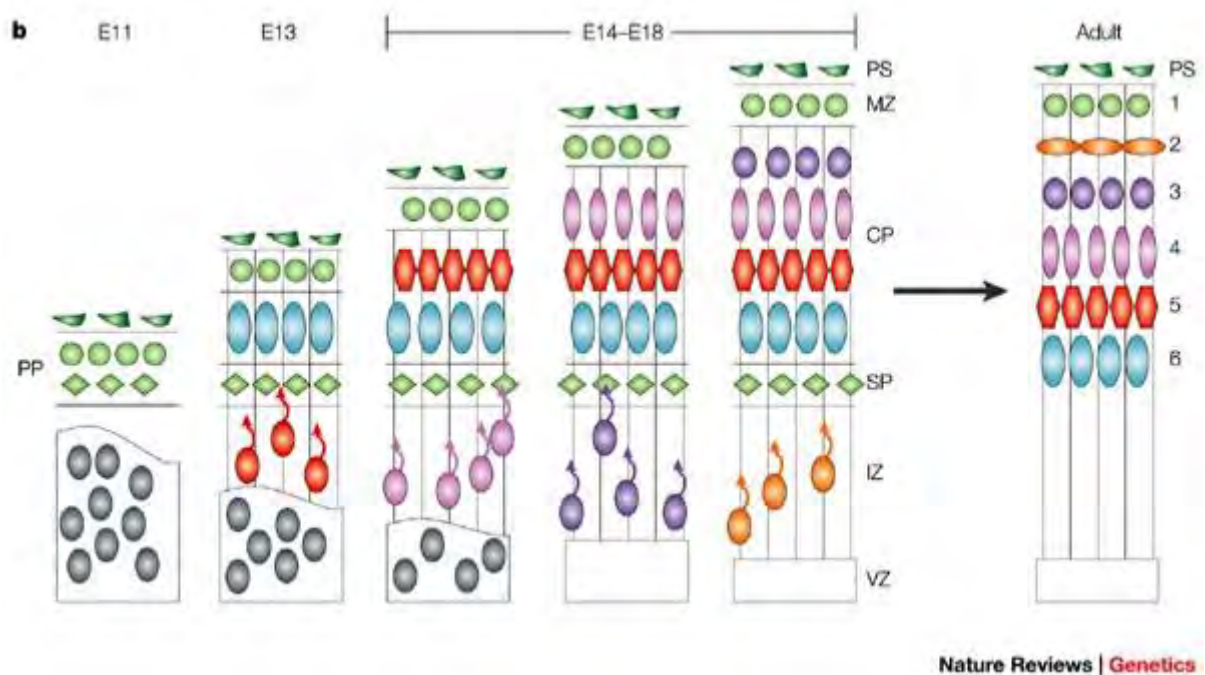


Fig. 23. Formation des couches du néocortex. La formation des couches cérébrales est médiée par la migration des neurones le long de la glie radiaire (traits verticaux). La première vague de migration forme la pré-plaque (PP). La seconde vague de neurone migre depuis la zone intermédiaire (IZ) et sépare la PP en zone marginale (MZ) et plaque profonde (subplate-SP) afin de créer la plaque corticale (CP). La CP s'étend, chaque couche neuronale traverse ses prédécesseurs pour aller se placer sous la MZ. A l'âge adulte, la SP dégénère. Restent les six couches finales sous la surface piale (PS) qui constituent le néocortex. (Gupta et al., 2002)

Arrivé au sommet des réseaux de glie radiaire, les neurones tardifs continuent de migrer le long des neurones précoces afin de coloniser des couches de plus en plus superficielles. La première vague de neurones en migration va donc former les couches profondes du cortex, alors que les vagues de migrations tardives permettront l'apparition des couches proches de la surface (Dobyns et al., 1993). Des changements morphologiques ont lieu tout au long de cette étape de migration, dû à des changements du cytosquelette notamment grâce à l'actine et aux microtubules (MT) (Liu, 2011).

Des perturbations de la migration des NSC et des neurones peuvent induire de nombreuses malformations cérébrales.

Beaucoup de facteurs interviennent à cette étape et le moindre changement de leur expression dans la quantité, le temps ou le lieu peut avoir des répercussions dramatiques sur le développement cérébral. Les maladies causées par des altérations de la migration neurale résultent d'une perturbation du mouvement normal des neurones immatures entre le site d'origine et leur destination finale durant le développement précoce. Beaucoup d'associations ont été décrites entre des défauts de migration neurale et des maladies telles que la lissencéphalie, la microcéphalie, la schizophrénie, l'autisme ou encore la dyslexie (Cannon, 2009) (Bi et al., 2009) (Kamiya et al., 2005) (Schumacher et al., 2006).

D- Différenciation en neurones

Durant la neuronogénèse, les NSC sortent du cycle de division, sous-régulent les marqueurs de multipotence et migrent dans la zone marginale (MZ) pour commencer à exprimer leurs capacités neuronales. A partir de la 22^{ème} semaine de gestation, les circuits de connexion corticaux se développent, la synaptogénèse se met en place (Kostovic et al., 2015). Dès que les cellules s'engagent dans le lignage neuronal, leur cycle cellulaire devient plus long. Cette augmentation de la longueur du cycle est due à une augmentation de la longueur de la phase G1, les autres phases restent constantes. Une longueur augmentée de la phase G1 dans les cellules neuro-épithéliales peut induire leur différenciation en neurones *in vivo* (Calegari and Huttner, 2003). Une hypothèse est que la différenciation en neurones est permise par l'association de la division asymétrique et de l'augmentation de longueur de la phase G1. La cellule fille qui a reçu le plus de matériel cellulaire peut devenir un neurone même si la phase G1 n'est pas très longue. En revanche, la cellule qui a reçu le moins de matériel cellulaire reste indifférenciée si la phase G1 est courte mais peut devenir un neurone si la phase G1 dure plus longtemps (Fig. 24).

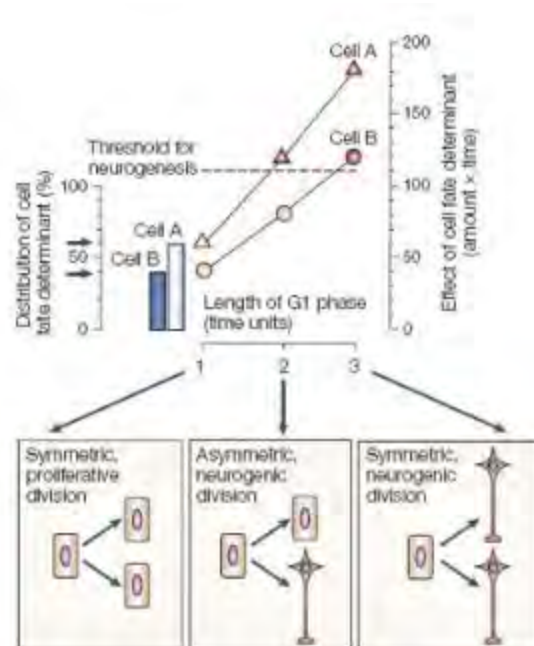


Fig. 24. La différenciation en neurones dépend de la division asymétrique et de la longueur de la phase G1. La division asymétrique, qui induit une répartition inégale du matériel cellulaire (60% dans la cellule A, 40% dans la cellule B), peut induire la différenciation en neurone d'une ou des deux cellules filles selon la longueur de la phase G1. Ni A ni B ne peuvent devenir des neurones après une unité de temps. A mais pas B devient un neurone après deux unités de temps. A et B deviennent des neurones après trois unités de temps. (Gotz and Huttner, 2005)

La différenciation en neurones se déroule schématiquement en deux étapes qui mettent en jeu de nombreux facteurs cellulaires. La spécification du lignage implique la surexpression des ligands de Notch. Notch permet l'expression des protéines pro-neurales dans les NSC sélectionnées. Sont alors exprimés les facteurs pro-neuraux, notamment les gènes bHLH (basic helix-loop-helix) comme la neurogénine (Ngn) 1-3, Mash1 ou Math1.

La signalisation Notch permet de sous-réguler le facteur d'auto-renouvellement MSI1 (Okano et al., 2005). La suppression des facteurs SoxB1 est un prérequis pour l'expression des facteurs pro-neuraux qui permettent la différenciation neuronale.

Les protéines Ngn1 et Ngn2 sont exprimées uniquement dans la VZ et dans le temps limité qui correspond au déclenchement de la neurogénèse. Ces protéines se dimérisent avec d'autres membres des bHLH. Ces hétérodimères agissent comme des facteurs de transcription et vont fixer des séquences d'ADN chargées positivement qui contiennent une séquence consensus « E-box domain » (CANNTG). Cette fixation permet d'activer l'expression de gènes tissu-spécifiques qui vont induire la différenciation en neurones. Ngn1 inhibe également la différenciation des NSC en astrocytes de façon indépendante de sa capacité à induire la neurogénèse.

Elle empêche l'acquisition de la morphologie astrocytaire et l'expression de GFAP, un marqueur protéique spécifique des astrocytes en séquestrant les facteurs de transcriptions indispensables à la gliogénèse (Sun et al., 2001). Ngn1 et Ngn2 contrôlent deux phases distinctes de la neurogénèse qui aboutissent à deux types de neurones distincts (Ma et al., 1999). Mash1 permet l'expression de gènes impliqués dans la sélection des différents lignages de neurones. Elle peut contrôler de nombreux aspects du programme neuronogénique (Letinic et al., 2002). L'expression de Mash1 avec deux autres facteurs : Brn2 et Myt1l dans les fibroblastes permet de générer des neurones fonctionnels (Vierbuchen et al.).

Des KO spécifiques des gènes Ngn1, Ngn2, Mash1 et Math1 montrent que chaque gène est impliqué dans la différenciation d'un sous-type particulier de neurones. Math1 promeut la différenciation en interneurones. Il existe un mécanisme de cross-inhibition entre Ngn1, Mash1 et Math1 pour permettre la génération de sous-types distincts de neurones (Gowan et al., 2001). L'expression d'autres facteurs comme NeuroD, Prox1 et Nsc1 permettent de consolider la spécification et permettent à la cellule de progresser vers la différenciation terminale. Sox21 est exprimé dans la VZ. Il a un rôle capital dans la progression de la neurogénèse. Il permet de déterminer si une cellule doit rester à l'état indifférencié ou s'engager dans le lignage neuronal. La capacité de Sox21 à diriger les NSC vers un état différencié est indépendante de l'expression des protéines pro-neurales. Par ailleurs, le facteur bHLH induit la neurogénèse grâce à sa capacité à sur-réguler Sox21. A l'inverse des facteurs SoxB1, il promeut la différenciation en neurones, notamment en neutralisant l'activité de ces derniers. La perte d'expression de Sox21 conduit à une prédominance de l'activité SoxB1 et un blocage de la neurogénèse de l'embryon (Sandberg et al., 2005).

D'autres facteurs sont largement utilisés dans la littérature pour marquer les neurones, comme HuC/D ou des facteurs de transcription régulant le développement neuronal. Le KO HuD chez la souris induit une augmentation de la capacité d'auto-renouvellement des NSC. Le nombre de NSC est largement augmenté chez ces animaux. Parallèlement, le nombre de cellules engagées dans la neurogénèse est diminué. Il apparaît que ces facteurs sont requis à différents moments du développement neuronal, et permettent une régulation négative de la capacité proliférative des NSC ainsi que l'acquisition par ces cellules des propriétés neuronales (Akamatsu et al., 2005).

II. La lissencéphalie

A- Généralités

La lissencéphalie concerne 1 naissance sur 100000. Le premier constat de lissencéphalie a eu lieu en 1914 mais il a fallu attendre 1984 pour que soit publié le premier rapport (Stratton et al., 1984). Le terme lissencéphalie vient de « cerveau lisse ». En effet, les cerveaux présentent un nombre diminué de circonvolutions. La lissencéphalie classique se traduit par un défaut de gyration : les symptômes vont de l'absence totale de circonvolutions (agyrie), la présence de circonvolutions anormales (pachygyrie) ou de bandes subcorticales hétérotopiques (SBH) (Fig. 25). La lissencéphalie est décomposée en 6 stades de sévérité clinique du plus sévère (stade 1 – agyrie complète) au moins grave (stade 6 - SBH seule).

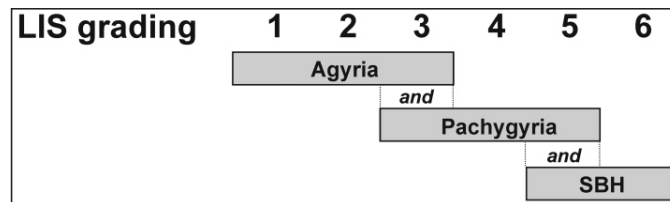


Fig. 25. Corrélation entre le stade de sévérité de la lissencéphalie (LIS) et les malformations cérébrales associées. Adapté d'après (Kato and Dobyns, 2003).

Une désorganisation des couches corticales est observée : le cortex est plus épais, et se compose de quatre couches corticales au lieu de six (Fry et al., 2014) (Fig. 26).

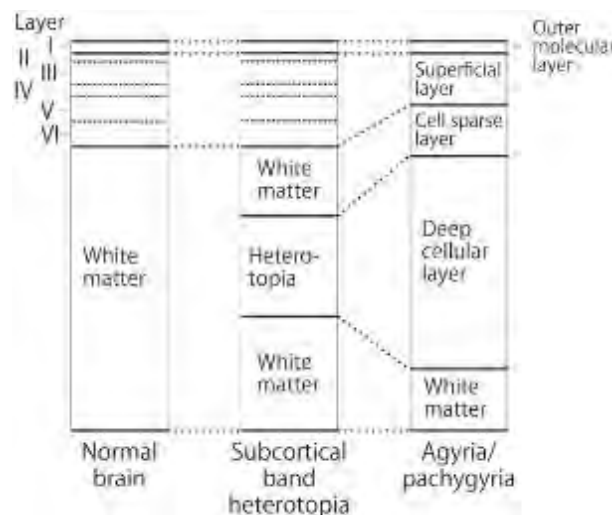


Fig. 26. Diagramme représentant l'organisation des couches corticales dans le spectre de gravité de la lissencéphalie comparé au cerveau normal. (Kato, 2015)

Les ventricules sont plus larges que la normale. Les populations cellulaires dans les couches corticales sont diminuées.

La prolifération des progéniteurs et la mise en place de la glie radiaire ne semblent pas altérées, ce qui suggère des anomalies dans l'initiation et/ou dans la continuité de la migration neurale. La lissencéphalie et le retard de gyration associé résultent d'une migration incomplète des neurones en différenciation dans le cortex cérébral vers le 3^e mois de gestation (Dobyns et al., 1993) (Fig. 27). Une étude clinique sur 63 fœtus présentant des malformations cérébrales sévères a montré que la lissencéphalie est due à un arrêt de la migration neuronale entre la 9^e et la 13^e semaine de gestation (Saillour et al., 2009).

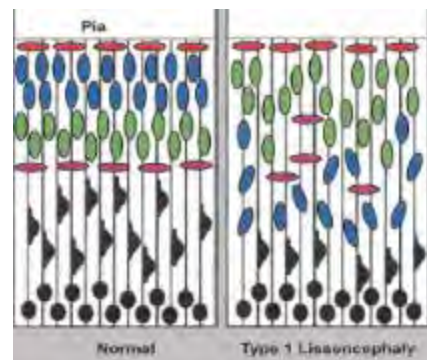


Fig. 27. Représentation schématique du développement cortical normal (à gauche) ou en présence d'un défaut de nucléokinèse tel que la lissencéphalie (à droite). Dans ce cas, la migration initiale est satisfaisante mais une partie des cellules reste dans la zone sous-corticale. (Lambert de Rouvroit and Goffinet, 2001)

Les anomalies de la migration neurale observés sont causées par une altération des mouvements centrosomiaux et nucléaires durant la nucléokinèse (Fig. 28). Ce mécanisme induit une perturbation de la sortie des NSC de la VZ et empêche la division des cellules de la glie radiaire.



Fig. 28. Les mouvements centrosomiaux et nucléaires sont absents dans les neurones des patients atteints de lissencéphalie. La migration neurale est perturbée et la division des cellules de la glie radiaire abolie. (Nulty et al., 2015)

Les patients présentent en général un fort retard mental, une grave épilepsie et des anomalies neurologiques sévères.

Deux gènes ont été identifiés comme capables d'induire des lissencéphalies lorsqu'ils sont mutés : *PAFAH1B1* ou *Lissencephaly 1 (LIS1)* (Reiner et al., 1993) et la *doublecortine (DCX)* (des Portes et al., 1998) (Gleeson et al., 1998). Le gène de la doublecortine est situé sur le chromosome X, il est responsable de la lissencéphalie associée à l'X. Seuls les hommes portant une mutation de *DCX* peuvent présenter une lissencéphalie, chez les femmes la mutation se traduit par l'apparition d'une SBH. De rares cas de lissencéphalies causées par des mutations de *LIS1* ou *DCX* sont associés avec des microcéphalies congénitales ou des hypoplasies cérébrales. Les phénotypes de lissencéphalie associés à ces gènes ont des caractéristiques distinctes, principalement le fait que la lissencéphalie associée à *LIS1* présente des anomalies plus sévères au niveau du cortex postérieur alors que la lissencéphalie associée à *DCX* montre des anomalies majoritairement antérieures (Fig. 29).

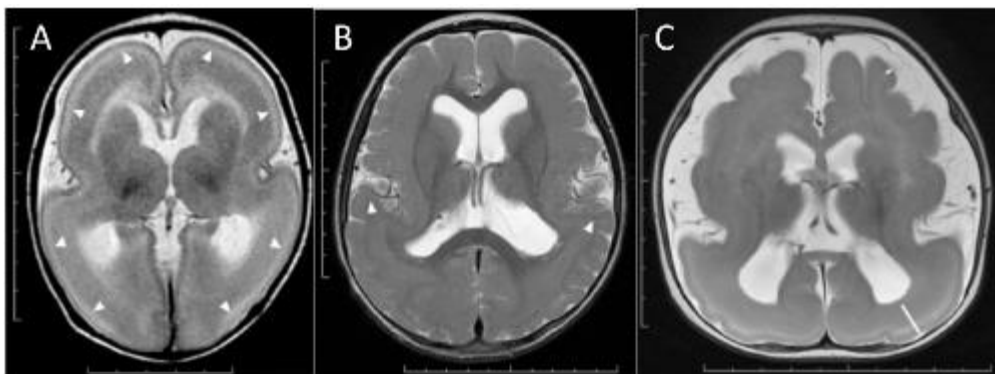


Fig 29. Anomalies dans le spectre de la lissencéphalie classique dues à des mutations de *LIS1* ou *DCX*. A. Agyrie complète chez un patient présentant une mutation du gène *DCX* (stade 1 sur l'échelle de sévérité). B. SBH chez un patient présentant une mutation du gène *DCX* (stade 5 sur l'échelle de sévérité). C. Pachygyrie antérieure et agyrie postérieure chez un patient présentant une mutation du gène *LIS1* (stade 3 sur l'échelle de sévérité). Adapté d'après (Kato, 2015).

Parmi les séquelles les plus sévères observées lors de l'infection par le HCMV, il a été observé des phénotypes dits « lissencéphalie-like » (Capretti et al.) (Bosnjak et al., 2011) (Hayward et al., 1991). Dans ce cas, l'infection seule suffit à induire le phénotype en dehors de toutes anomalies génétiques. Cependant, les mécanismes causatifs de ce phénotype « lissencéphalie-like » dans le cadre d'une infection à HCMV n'ont jamais été décrits.

B- Lissencephaly 1 (LIS1)

1. Fonctions

LIS1, produit du gène *PAFAH1B1*, est une des protéines clés de la migration neurale et neuronale. Le gène est situé sur le chromosome 17p13.3 et est constitué de 11 exons codant pour une région de 1233 paires de bases (bp) (Lo Nigro et al., 1997).

LIS1 a d'abord été identifiée comme la sous-unité 1 régulatrice non-catalytique de l'isoforme 1b acetylhydrolase du facteur d'activation des plaquettes (PAF).

C'est un homologue de la protéine *NudF* d'*A. nidulans* impliqué dans le déroulement de la nucléokinèse. LIS1 est très conservée entre l'humain et la souris et présente 42% d'homologie avec *NudF*. La fonction de LIS1 est de s'associer aux microtubules pour réguler la dynéine cytoplasmique (Xiang et al., 1995). Ce rôle est très conservé chez les eucaryotes. Chez les mammifères, LIS1 interagit directement avec la chaîne lourde de la dynéine cytoplasmique (Sasaki et al., 2000). LIS1 induit une augmentation de la polymérisation des microtubules et une diminution de leur dépolymérisation *in vitro* (Sapir et al., 1997). LIS1 co-immunoprécipite avec des sous-unités de la dynéine et de la dynactine dans la VZ et la CP du cerveau en développement. L'interaction entre LIS1 et la dynéine est capitale pour l'organisation des microtubules dans la périphérie cellulaire, le dosage de LIS1 régule l'action de la dynéine dans les processus cellulaires. Le complexe a un rôle important dans l'arborisation dendritique, la croissance de l'axone et le transport axonal (Liu et al., 2000). L'interaction LIS1-dynéine pourrait également réguler la division mitotique et la ségrégation des chromosomes. LIS1 est principalement exprimé dans le cerveau embryonnaire et adulte. Son expression est plus importante dans les neurones que dans les autres types cellulaires et permettrait la migration des neurones et la croissance de leur axone (Smith et al., 2000). LIS1 est exprimé de façon plus importante dans les progéniteurs neuronaux pendant la phase précoce du développement. Cependant, le fait que l'expression de LIS1 soit toujours observée au stade tardif du développement suggère une ou plusieurs fonctions de LIS1 indépendantes de la migration neuronale (Kondratova et al., 2005).

2. Association avec la lissencéphalie

65% des lissencéphalies sont dues à une mutation du gène *PFAH1B1*.

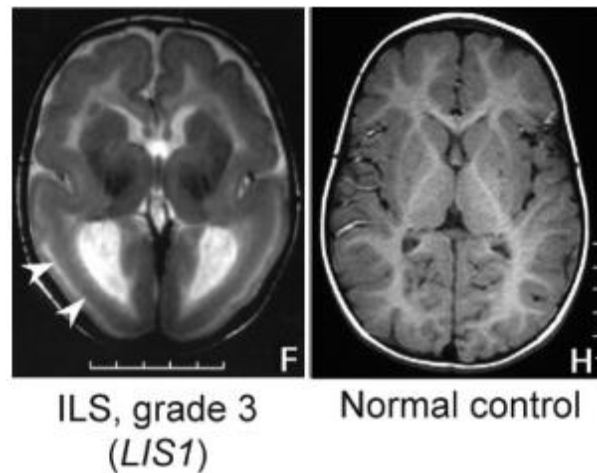


Fig. 30. Cas de lissencéphalie classique (ILS) due à des mutations de *LIS1*, au stade 3 (F) de sévérité comparé au cas contrôle (H). Adapté d'après (Kato and Dobyns, 2003).

L'haplo-insuffisance, la duplication ou la triplification du gène *PAFAH1B1* induisent toutes un phénotype de lissencéphalie (Haverfield et al., 2009) (Fig. 30).

Plus de 70 mutations intragéniques dans le gène *PAFAH1B1* (délétions ou mutations non-sens) qui entraînent un phénotype de lissencéphalie ont été identifiées chez l'homme (Cardoso et al., 2002). Les duplications/triplifications du gène *PAFAH1B1* provoquent un retard développemental cérébral sévère, incluant des cas de microcéphalie ou d'atrophie du cervelet. Les patients présentent des anomalies de la structure cérébrale. Ces anomalies ont pour conséquences des troubles neurocomportementaux, un retard de croissance, un retard mental ainsi que des désordres de type hyperactivité ou déficit de l'attention (Bi et al., 2009).

Plusieurs hypothèses ont été émises pour expliquer le rôle de *LIS1* dans le phénotype de la lissencéphalie. L'une d'elles serait que l'altération de l'expression de *LIS1* pourrait empêcher la dégradation du PAF dans le cerveau. Cependant, l'accumulation de PAF dans le cerveau n'a jamais été formellement associée au phénotype de lissencéphalie. *LIS1* forme le complexe pafah1b après association avec ses partenaires pafah1b2 et pafah1b3, qui est responsable de l'activité acétyl hydrolase qui permet la dégradation du PAF. Etant donné que l'abolition du fonctionnement de pafah1b2 et pafah1b3 n'induit pas de lissencéphalie, il ne semble donc pas que cette activité enzymatique soit responsable à elle seule du phénotype (Clark, 2015).

La signalisation médiée par le PAF pourrait cependant être impliquée dans la lissencéphalie. En effet, le récepteur pour le PAF (PTAFR) est exprimé dans le cerveau en développement. Les souris KO pour le gène *ptafr*^{-/-} présentent une désorganisation complète du cervelet. Les souris double mutantes *pafah1b1*^{-/+} *ptafr*^{-/-} montrent une migration neuronale largement ralentie (Tokuoka et al., 2003).

D'autres hypothèses concernent l'action de LIS1 sur la dynéine et les microtubules. En effet, les cellules délétées en LIS1 présentent une augmentation des microtubules péri-nucléaires et à leur diminution à la périphérie cellulaire. Les modifications du niveau d'expression de LIS1 perturbent le couplage noyau-cytoplasme et réduisent la distance entre noyau et centrosome durant la migration neuronale. Ce défaut de couplage ralentit la migration des neurones (Moon and Wynshaw-Boris, 2013).

LIS1 a également un rôle dans la régulation du cytosquelette d'actine via la modulation de CDC42/RAC1 (Kholmanskikh et al., 2006). Une carence en LIS1 dans les neurones induit une réduction de l'actine-F au cône de croissance et un nombre diminué de filopodes, ce qui entraîne une migration neuronale ralentie (Kholmanskikh et al., 2003).

Une autre hypothèse implique des modifications du minutage des divisions cellulaires, car la survenue de la dernière division cellulaire est connue pour affecter la localisation finale des neurones corticaux.

Il a été proposé que l'altération de la distribution des neurones dans la lissencéphalie puisse résulter d'une perturbation de l'interaction LIS1-dynéine lors de la division cellulaire.

C- La doublecortine (DCX)

1. Fonctions

Le gène *DCX* est constitué de 9 exons et se situe sur le chromosome Xq22.3-q23. Il code pour une protéine de 360 acides aminés, la doublecortine (DCX), qui n'est présente que chez les mammifères. DCX appartient à la famille des MAP (microtubule-associated proteins) qui s'associent et stabilisent les microtubules, leur permettant de polymériser. Des études montrent que DCX et LIS1 interagissent physiquement *in vitro* et *in vivo* et ces deux protéines peuvent être co-immunoprécipitées à partir d'extraits cérébraux (Caspi et al., 2000) (Horesh et al., 1999). DCX est exprimé exclusivement dans le cerveau fœtal, au niveau des cellules souches neurales et des neurones en différenciation. DCX est nécessaire au bon développement cérébral, son expression et sa phosphorylation sont régulées de façon très précise. Le niveau d'expression de DCX reflète le niveau de neurogénèse chez la souris (Couillard-Despres et al., 2005). DCX est exprimée durant tout le développement cérébral, en particulier par les cellules en migration au niveau de la VZ et de la CP (Fry et al., 2014). L'expression de DCX dans les neurones orientés de façon radiale et tangentielle suggère que DCX pourrait être impliquée dans les deux types de migration : radiale et tangentielle (Meyer et al., 2002). DCX peut être phosphorylée par CDK5 sur son résidu Sérine en position 297 (Ser 297), ce qui diminue son affinité pour les microtubules et réduit la polymérisation *in vitro*. L'inhibition de CDK5 ainsi que la mutation de la Ser 297, bloque l'effet de DCX sur la migration neurale.

La phosphorylation de DCX permettrait donc de réguler son action sur la migration des progéniteurs (Tanaka et al., 2004). Chez la souris, DCX est exprimée dans les neurones en migration du système nerveux central et périphérique durant le développement embryonnaire et post-natal (Gleeson et al., 1999). Il a donc été proposé que DCX régule directement la migration neuronale en contrôlant l'organisation et la stabilité des microtubules. DCX est également impliquée lors de la différenciation en neurones en permettant la croissance des neurites (Shmueli et al., 2001).

2. Association avec la lissencéphalie

Les mutations du gène *DCX* sont observées dans 10% des lissencéphalies.

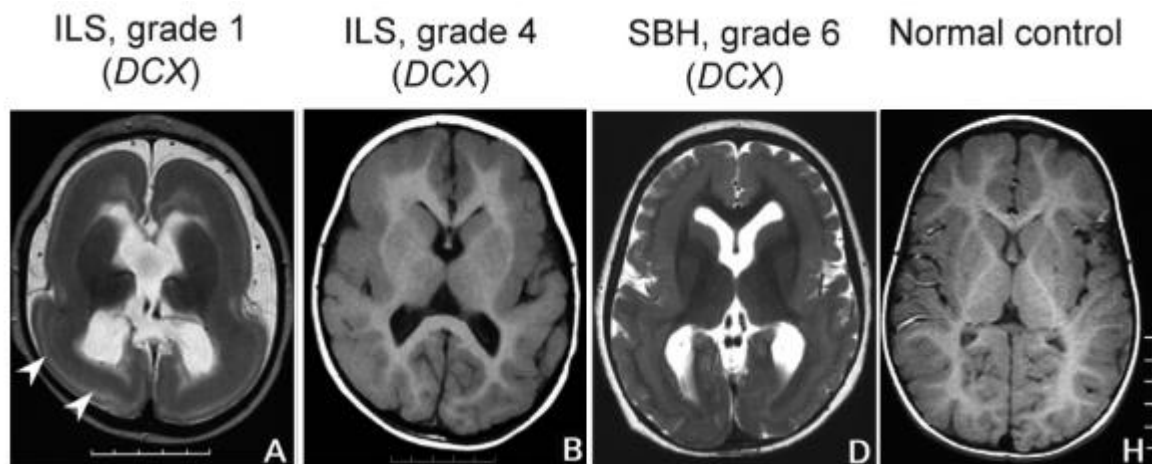


Fig. 31. Cas de lissencéphalie classique (ILS) ou SBH dues à des mutations de *DCX* au stade 1 (A), 4 (B) et 6 (D) de sévérité comparés au cas contrôle (H). Adapté d'après (Kato and Dobyns, 2003).

Des mutations intragéniques et des duplications du gène *DCX* ont été rapportées comme induisant des lissencéphalies (Haverfield et al., 2009) (Fig. 31).

Plusieurs hypothèses existent sur les mécanismes de la lissencéphalie associée à DCX. Il est probable que la croissance retardée de l'axone, observée quand DCX est exprimée de façon anormale, soit responsable lésions cérébrales chez ces patients. En effet, la lissencéphalie est associée à des symptômes comme l'épilepsie, induite par un défaut de connectivité des neurones (Kato and Dobyns, 2003).

De même, les neurones mutants pour DCX présentent une faiblesse du couplage noyau-cytoplasme qui induit un retard des mouvements nucléaires et centrosomaux, nécessaires à la migration.

DCX agit également sur le cytosquelette d'actine en régulant la voie RELN (Reelin). Le changement d'expression de DCX pourrait avoir des conséquences sur l'interaction actine-microtubules et ralentir ainsi la migration (Moon and Wynshaw-Boris, 2013).

L'infection par le HCMV peut aussi provoquer un phénotype lissencephaly-like chez le fœtus, en dehors de causes génétiques. Nous nous sommes donc intéressés aux protéines LIS1 et DCX, connues pour leurs rôles dans la lissencéphalie, dans les cellules souches neurales infectées par le HCMV.

RESULTATS

I. L'activation de PPAR γ lors de l'infection par le HCMV inhibe la neuronogénèse dans les cellules souches neurales humaines

Ce travail a fait l'objet d'un article publié dans PLoS Pathogens en avril 2016 :

“PPAR γ Is Activated during Congenital Cytomegalovirus Infection and Inhibits Neuronogenesis from Human Neural Stem Cells”

Maude Rolland, Xiaojun Li, Yann Sellier, Hélène Martin, Teresa Perez-Berezo, Benjamin Rauwel, Alexandra Benchoua, Bettina Bessières, Jacqueline Aziza, Nicolas Cenac, Minhua Luo, Charlotte Casper, Marc Peschanski, Daniel Gonzalez- Dunia, Marianne Leruez-Ville, Christian Davrinche, Stéphane Chavanas

PLoS Pathogens | doi:10.1371/journal.ppat.1005547

1. Introduction

L'infection congénitale par le HCMV est la première cause mondiale d'anomalies neurologiques chez l'enfant. De nombreuses études se sont int  ress  es aux conséquences de l'infection par le HCMV sur le cerveau.

Ces conséquences seraient li  es à l'infection des progéniteurs neuraux par le CMV. En effet, des études ont établi que le cytomégalovirus murin (MCMV) possédait un tropisme préférentiel pour les cellules souches et progénitrices neurales (NSPC) (Tsutsui et al., 2008). Ces cellules restent aussi des cibles privil  gi  es du virus dans le cerveau adulte. Le MCMV peut également infecter les neurosph  res. Les NSPC et les neurosph  res peuvent permettre la latence et la réactivation du virus. L'infection empêche la prolifération des NSPC et leur différenciation. La différenciation gliale est plus affect  e que la différenciation neuronale. Les auteurs concluent que les NSCP sont les premières cibles du MCMV et que leur infection pourrait être à l'origine des malformations cérébrales caus  es par l'infection congénitale. Plusieurs études montrent que l'infection par le MCMV des NSC murines entraîne une diminution du nombre de NSC et de précurseurs neuronaux et interfère avec leur différenciation (Kosugi et al., 2000) (Mutnal et al., 2011).

Chez l'homme, les progéniteurs neuraux sont également une cible pour le HCMV. La permissivité des cellules au HCMV a été   tudi  e à partir de cellules pluripotentes induites (iPS)    partir de fibroblastes et utilis  es pour produire des NSC, des NPC et des neurones. Dans ce contexte, les iPS sont susceptibles à l'infection mais le cycle viral y est abortif.

Les NSC sont permissives et les NPC représentent le stade le plus permissif. Les neurones dérivés d'iPS sont quant à eux majoritairement non permissifs à l'infection.

Les NSC et NPC infectées présentent une différenciation en neurones altérée. En réponse à une stimulation par le glutamate, ces neurones montrent un flux calcique diminué (D'Aiuto et al., 2012). L'infection par le HCMV a aussi été étudiée dans les NPC humaines provenant d'autopsie néonatale. Ces NPC et les neurones qui en dérivent sont permissifs à l'infection (Luo et al., 2008). L'infection induit une différenciation en neurones prématurée et anormale de ces NPC (Odeberg et al., 2006), associée à une diminution de la multipotence (Luo et al., 2010). La mortalité des NPC est augmentée lors de l'infection et la différenciation en astrocyte est inhibée (Odeberg et al., 2007). Cependant, les mécanismes du CMV conduisant à ces impacts sur la différenciation des NSC et NPC sont à l'heure actuelle très mal connus.

2. Objectifs

Sur la base de ces études, nous avons voulu modéliser le développement cérébral et la neurogénèse. Pour cela, nous avons utilisé des NSC humaines dérivées de cellules souches embryonnaires (ES) (Boissart et al., 2013). Ces cellules s'auto-renouvellent et présentent une croissance continue dans des conditions définies. Elles permettent de générer des neurones sous l'induction de facteurs de croissance. Leur caractérisation et leur conditions de différenciation ont déjà été établies (Boissart et al., 2012). Nous avons évalué leur permissivité et étudié les conséquences de cette infection sur la différenciation neurale.

Dans ce contexte, nos objectifs étaient :

- 1) De déterminer l'effet de l'infection sur la différenciation des NSC.
- 2) De précédentes études réalisées au laboratoire ont mis en évidence le rôle capital du facteur de transcription PPAR γ lors de l'infection des cellules du placenta par le HCMV (Rauwel et al., 2010). PPAR γ étant connu pour avoir un rôle majeur dans le développement cérébral, nous avons choisi de nous y intéresser en particulier, notamment d'étudier l'effet de l'infection par le HCMV sur l'expression et l'activité de PPAR γ .
- 3) D'étudier le rôle de PPAR γ lors de l'infection, en particulier dans la neuronogénèse. Nous avons, pour cela, transduit des NSC avec un lentivirus contenant le gène PPAR γ (désignées sous le terme NSC-P γ), permettant ainsi une surexpression ectopique de PPAR γ . Pour activer PPAR γ , nous avons utilisé la rosiglitazone, un agoniste de PPAR γ appartenant à la famille des TZD.
- 4) D'identifier le ligand physiologique de PPAR γ lors de l'infection.

5) De valider nos observations sur des coupes de cerveaux de fœtus humains (23-28 semaines) infectés *in utero* par le HCMV et présentant de graves anomalies cérébrales.

RESEARCH ARTICLE

PPAR γ Is Activated during Congenital Cytomegalovirus Infection and Inhibits Neuronogenesis from Human Neural Stem Cells

Maude Rolland¹, Xiaojun Li², Yann Sellier^{3,4}, Hélène Martin¹, Teresa Perez-Berezo¹, Benjamin Rauwel¹, Alexandra Benchoua^{5,6}, Bettina Bessi eres^{3,4}, Jacqueline Aziza⁷, Nicolas Cenac¹, Minhua Luo², Charlotte Casper^{1,8}, Marc Peschanski^{5,6}, Daniel Gonzalez-Dunia¹, Marianne Leruez-Ville^{3,4}, Christian Davrinche¹, Stéphane Chavanas^{1*}

1 Centre de Physiopathologie Toulouse Purpan, INSERM UMR 1043, CNRS UMR 5282, Université Paul Sabatier, Toulouse, France, **2** Laboratory of Virology, Wuhan Institute of Virology, Chinese Academy of Sciences, Wuhan, China, **3** Hôpital Necker-Enfants Malades, Assistance Publique-Hôpitaux de Paris, Paris, France, **4** Université Paris Descartes, Sorbonne Paris Cité, Paris, France, **5** I-STEM, INSERM U861, AFM, Evry, France, **6** CECS, UEVE U861, Evry, France, **7** Département d'Anatomie Pathologique, IUCT-Oncopole, Toulouse, France, **8** Neonatal Unit, Children's Hospital, Toulouse, France

 These authors contributed equally to this work.

* stephane.chavanas@inserm.fr



click for updates

 OPEN ACCESS

Citation: Rolland M, Li X, Sellier Y, Martin H, Perez-Berezo T, Rauwel B, et al. (2016) PPAR γ Is Activated during Congenital Cytomegalovirus Infection and Inhibits Neuronogenesis from Human Neural Stem Cells. *PLoS Pathog* 12(4): e1005547. doi:10.1371/journal.ppat.1005547

Editor: Robert F. Kalejta, University of Wisconsin-Madison, UNITED STATES

Received: September 16, 2015

Accepted: March 12, 2016

Published: April 14, 2016

Copyright:   2016 Rolland et al. This is an open access article distributed under the terms of the [Creative Commons Attribution License](https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/), which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original author and source are credited.

Data Availability Statement: All relevant data are within the paper and its Supporting Information files.

Funding: This study was financially supported by the Institut de la Sant e et de la Recherche Médicale (INSERM) (inserm.fr), Centre National de la Recherche Scientifique (CNRS) (cnrs.fr), Université Toulouse Paul Sabatier (UPS) (univ-tlse3.fr), Association Française contre les Myopathies (AFM-T el ephon) (afm-telethon.fr), Assistance Publique-Hôpitaux de Paris (AP-HP) (aphp.fr), Université Paris Descartes (UPD) (parisdescartes.fr) and Chinese Academy of Sciences (CAS) (english.cas.cn). MR

Abstract

Congenital infection by human cytomegalovirus (HCMV) is a leading cause of permanent sequelae of the central nervous system, including sensorineural deafness, cerebral palsies or devastating neurodevelopmental abnormalities (0.1% of all births). To gain insight on the impact of HCMV on neuronal development, we used both neural stem cells from human embryonic stem cells (NSC) and brain sections from infected fetuses and investigated the outcomes of infection on Peroxisome Proliferator-Activated Receptor gamma (PPAR γ), a transcription factor critical in the developing brain. We observed that HCMV infection dramatically impaired the rate of neuronogenesis and strongly increased PPAR γ levels and activity. Consistent with these findings, levels of 9-hydroxyoctadecadienoic acid (9-HODE), a known PPAR γ agonist, were significantly increased in infected NSCs. Likewise, exposure of uninfected NSCs to 9-HODE recapitulated the effect of infection on PPAR γ activity. It also increased the rate of cells expressing the IE antigen in HCMV-infected NSCs. Further, we demonstrated that (1) pharmacological activation of ectopically expressed PPAR γ was sufficient to induce impaired neuronogenesis of uninfected NSCs, (2) treatment of uninfected NSCs with 9-HODE impaired NSC differentiation and (3) treatment of HCMV-infected NSCs with the PPAR γ inhibitor T0070907 restored a normal rate of differentiation. The role of PPAR γ in the disease phenotype was strongly supported by the immunodetection of nuclear PPAR γ in brain germinative zones of congenitally infected fetuses (N = 20), but not in control samples. Altogether, our findings reveal a key role for PPAR γ in neurogenesis and in the pathophysiology of HCMV congenital infection. They also pave the way to the identification of PPAR γ gene targets in the infected brain.

was financially supported by UPS. XL was financially supported by CNRS and CAS. YS was financially supported by AP-HP and UPD. The funders had no role in study design, data collection and analysis, decision to publish, or preparation of the manuscript.

Competing Interests: The authors have declared that no competing interests exist.

Author Summary

Congenital infection by human cytomegalovirus (HCMV) might result in permanent neurological sequelae, including sensorineural deafness, cerebral palsies or devastating neurodevelopmental abnormalities. Infants with such sequelae represent about 0.1% of all live births (>5500 per year in the USA). Given the considerable health and societal burden, a better insight on disease pathogenesis is urgently needed to design new therapeutic or prognostic tools. Here, we studied the impact of HCMV on neuronal development, using human neural progenitors (NSC) as a disease model. In particular, we investigated the outcome of infection on Peroxisome Proliferator-Activated Receptor gamma (PPAR γ , a key protein in the regulation of metabolism, inflammation and cell differentiation. We disclosed that HCMV infection strongly increases levels and activity of PPAR γ in NSCs. In vitro experiments showed that PPAR γ activity inhibits the differentiation of NSCs into neurons. We also found increased PPAR γ expression in brains of in utero infected fetuses, but not in controls, suggesting that PPAR γ is a key effector of HCMV infection also in vivo. Our study provides new insights on the pathogenesis of HCMV infection and paves the way to the discovery of PPAR γ -related molecules secreted in the infected brain.

Introduction

Congenital infection by human cytomegalovirus (HCMV) is a leading cause of permanent abnormalities of the central nervous system [1]. About 1% of newborns are congenitally infected with HCMV each year in the USA, as a result of either primary infection of a seronegative mother, or reinfection / viral reactivation in a seropositive mother during pregnancy. Ten percent of congenitally infected newborns are symptomatic at birth, and most of them (60–90%) display neurological sequelae [2]. Further, 10 to 15% of congenitally infected newborns that are asymptomatic at birth show neurological disorder with onset later in infancy [2]. The most severely affected fetuses or newborns show brain development abnormalities such as microcephaly, lissencephaly or polymicrogyria [2–4]. The most frequent permanent sequelae include mental and/or psychomotor disabilities, sensorineural hearing or vision loss, and/or spastic cerebral palsies. Overall, patients with permanent sequelae represent up to 0.1–0.2% of all live births (>5500 per year in the USA). The direct annual care costs for patients are estimated at \$1–\$2 billion in the USA [5]. No vaccine or reliable prognosis tools are available to date, except for ultrasound examination of macroscopic brain abnormalities. Considering the dramatic health and societal burden of congenital HCMV infection, it is clear that a better insight on its pathogenesis is urgently needed to provide new therapeutic and prognostic tools.

Human cytomegalovirus (HCMV) is a beta herpes virus that infects and replicates in a broad spectrum of organs and cell types. Infection of neural progenitor cells (NPCs) in the developing brain is thought to be a primary cause of the neurological sequelae due to HCMV congenital infection. Consistent with this hypothesis, studies using mouse brain slices or neurospheres reported that murine cytomegalovirus (MCMV) preferentially infected NPCs in the developing brain [6, 7]. Further studies by others and us showed that mouse or human NPCs obtained from neonatal autopsy tissues were permissive to HCMV infection in vivo or ex vivo [8–11]. These reports, however, revealed considerable diversity in the phenotype of NPCs following HCMV infection. Indeed, HCMV infection of neural progenitors was found to (i) inhibit self-renewal and proliferation, along with the induction of apoptosis [11], (ii) inhibit astrocyte differentiation [12], (iii) result in premature and abnormal differentiation [8], (iv) reduce the number of proliferating CD24-expressing NPCs [10]. Whatsoever, common to all

studies was the observation that HCMV infection impaired the differentiation of NPC into neurons. Accordingly, two recent studies showed defective neuronal differentiation of neural stem cells generated from human induced pluripotent stem (iPS) cells upon in vitro HCMV infection [13, 14]. Despite these advances, the specific cellular and molecular mechanisms underlying the impaired neuronogenesis consecutive to HCMV infection still remain elusive. Given that a number of studies have established that peroxisome proliferator-activated receptor γ (PPAR γ) is critical for proper brain development (reviewed in [15]), we reasoned that PPAR γ may be involved in the impact of HCMV infection on neural progenitor cells. PPAR γ is a ligand-dependent transcription factor, member of the nuclear receptor superfamily, which plays key roles in regulating cellular function and tissue homeostasis [16, 17]. Natural PPAR γ ligands include 15-deoxy- $\Delta^{12,14}$ prostaglandin (PG) J₂ (15d-PGJ₂), 15-hydroxyeicosatetraenoic acid (15-HETE), 9- or 13-hydroxyoctadecadienoic acid (9/13-HODE), all derived from oxidation cascades of poly-unsaturated fatty acids [16].

Here, we describe a new model of infection based on highly neuronogenic human neural stem cells (NSCs) derived from embryonic stem (ES) cells [18]. With this model, we examined the role of PPAR γ in the neuropathophysiology of HCMV congenital infection. We further extended our observations to a collection of autopsy samples from HCMV-infected fetuses.

Results

NSCs from human embryonic stem cells are permissive to HCMV infection

NSCs derived from embryonic stem cells showed self-renewal and continuous growth in defined conditions without the need of generating neurospheres. They expressed the multipotency marker SOX2 and the marker Nestin, and showed ability to differentiate into neurons positive for the markers HUC/D and β III tubulin (Fig 1). An in-depth phenotypical characterization of NSC has been published elsewhere [19].

We first assessed the permissivity of NSC cultures to HCMV infection. Immunofluorescence analysis revealed that only few cells displayed a clear nuclear staining to HCMV Immediate Early antigen (IE) 24 h post infection (pi). At 48h pi, approximately 5% of cells showed IE positive immunostaining (MOI 1 or 10) (Fig 2A). Thereafter, an increasing number of cells immunoreactive to IE were observed over time after HCMV infection, with up to 30% of IE-positive cells by 16 days pi (Fig 2B). Together, these results show that NSC cultures become progressively more permissive to HCMV infection overtime although the reason for this delayed kinetics is presently unknown. Our results are, however, consistent with previous reports showing that human neural progenitor cultures contain only 23% of IE-positive cells seven days after infection by the HCMV laboratory strain Towne when infected at a MOI of 1 [11]. All cells, including the IE-positive cells, remained immunoreactive to SOX2, suggesting that infection did not cause detectable changes in the stem cell status of NSCs (S1 Fig). As a control, no cell showed staining to IE when the inoculum had been previously UV-irradiated.

The 86-kDa form of IE, which is required for HCMV replication, was detected by western blot analysis as soon as 4 days pi (Fig 2B). Likewise, the early and late antigens UL44 and pp28 were immuno-detected from 8 days pi (Fig 2C). Electron microscopy revealed morphologically mature HCMV particles in the cytoplasm and pericellular space of infected NSCs, along with dense bodies and immature particles (Fig 2D). Titration of viral particles present in the medium of infected NSCs was performed using recipient MRC5 cells and fluorescence unit forming assay, which confirmed the presence of infectious HCMV particles (up to 4.10^4 /ml infectious particles released the 8th day pi when the MOI was 10) (Fig 2E).

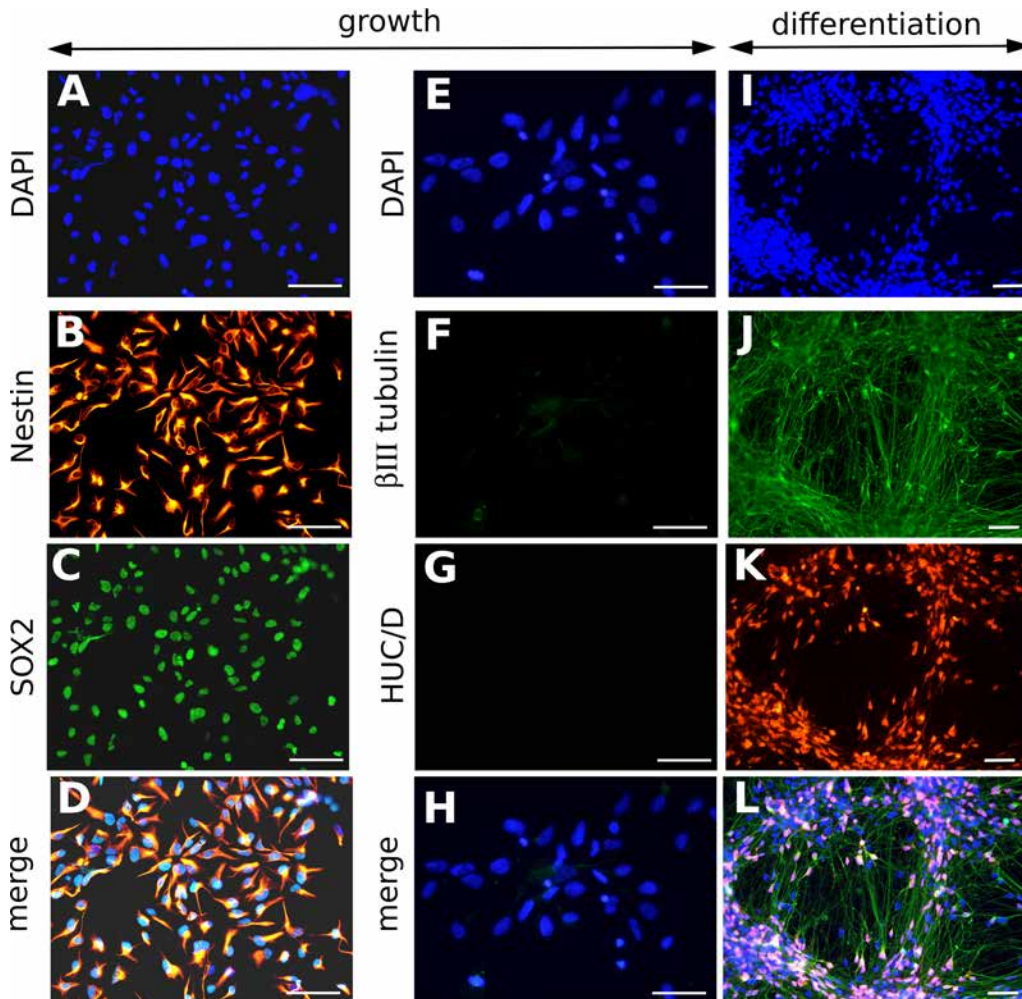


Fig 1. Characterization of neural stem cells from human ES cells (NSCs). Representative immunofluorescence analyses of NSCs cultured in growth medium (A-H) or in differentiation medium, 8 days after the onset of differentiation (I-L), using DAPI staining (A, E, I), or antibodies specific to Nestin (B), SOX2 (C), βIII tubulin (F, J) and HUC/D (G, K). Merged pictures are shown (D, H, L). In differentiation medium, neurons positive for βIII tubulin (J) and HUC/D (K) went alongside to undifferentiated NSCs, which nuclei appeared blue in the merged picture (L). Scale bar: 50 μm.

doi:10.1371/journal.ppat.1005547.g001

HCMV infection impairs neuronogenesis

We next investigated whether infection altered the differentiation of NSCs into neurons. To initiate the differentiation of NSCs, it is critical to detach cells and to re-install them at a lower density on a fresh support, in the presence of increased concentration of laminin. In our preliminary experiments, we observed that the majority of infected cells were lost during these steps. As a result, differentiation of NSC cultures had to be initiated before any infection. Using this procedure, we observed that differentiating cultures of HCMV-infected NSCs displayed a dramatically decreased number of cells immunoreactive to βIII tubulin when compared to uninfected cultures (Fig 3A). Consistent with this observation, the overall level of βIII tubulin was strongly reduced in infected cultures (Fig 3B). To better appreciate the HCMV-triggered blockade of neuronal differentiation, we set up an automated procedure to screen populations of differentiating NSC grown in a 96-well plate format, based on the nuclear markers HUC/D (neurons) and SOX2 (NSCs). This analysis confirmed that the absolute and relative numbers of generated neurons decreased strongly and significantly as soon as 4 days pi in infected

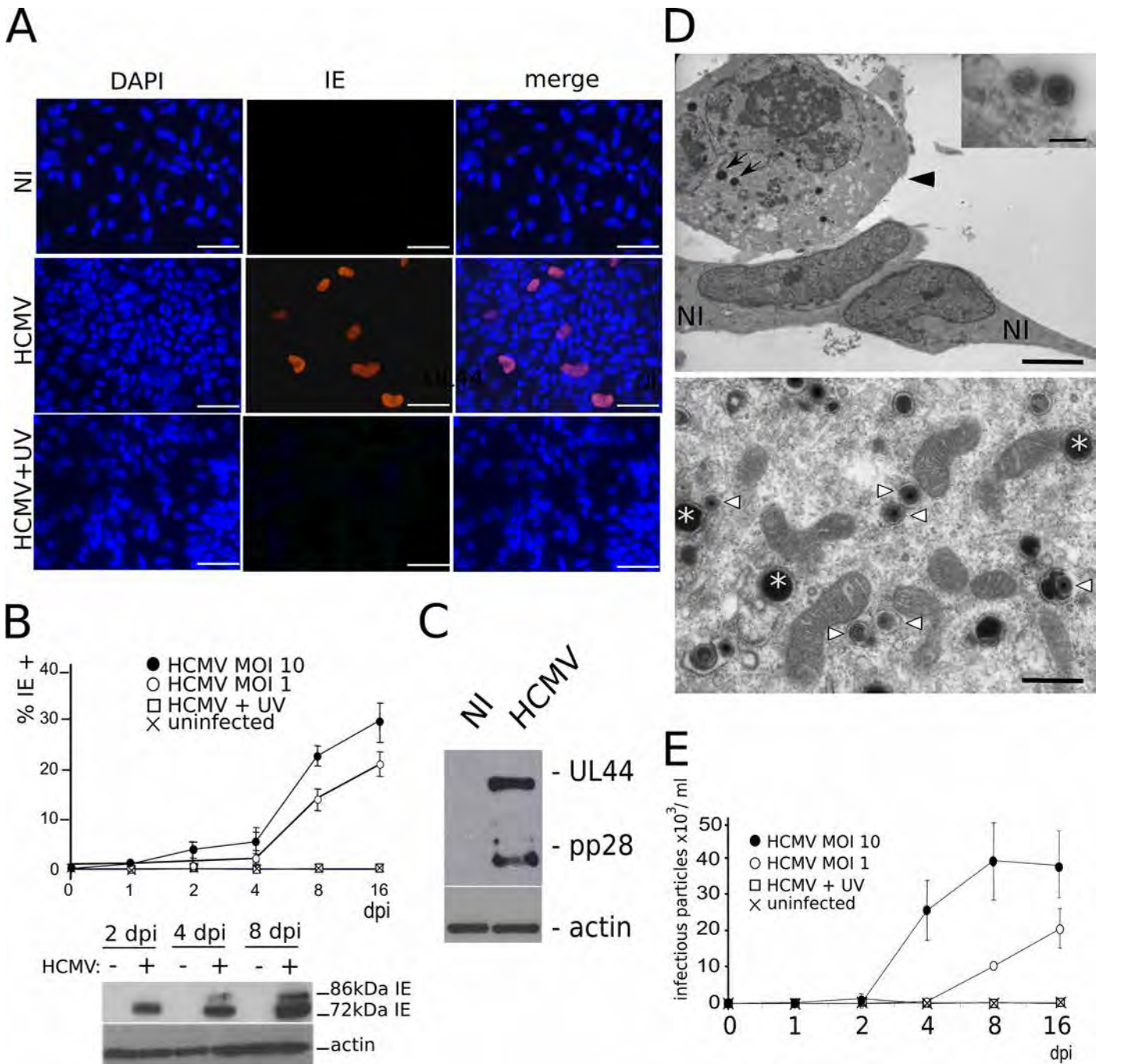


Fig 2. NSCs are permissive to HCMV infection. (A) Immunofluorescence analysis of NSCs infected by live (HCMV) or UV-irradiated (HCMV+UV) HCMV, or uninfected (NI), showing nuclear staining to the HCMV Immediate Early antigen (IE) two days post infection (dpi) at a multiplicity of infection (MOI) of 10. DAPI staining and merged pictures are shown. Scale bar: 50 μ m. (B) Top: automated counting of immunofluorescence data showing increasing numbers of IE-positive NSCs over time in cultures infected by live HCMV at a MOI of 1 or 10, but not in cultures infected by UV-irradiated HCMV or in uninfected cultures. Data represent means \pm CI of 2 independent experiments, each being performed in triplicate. Bottom: western blot analysis showing increasing levels along time of the 72 and 86 kDa isoforms of IE in infected NSCs (MOI 10). (C) Western blot analysis showing production of the early and late HCMV antigens UL44 and pp28, respectively, in infected NSCs (MOI 10), at 8 days pi. (D) Top: transmission electron microscopy of NSC cultures infected by HCMV (MOI 10), showing a cytomegalic NSC (arrowhead) and lipid vesicles (arrows), close to two morphologically normal NSCs (NI), and HCMV particles adsorbed onto the cell surface (inset). Scale bar: 5 μ m or 0.2 μ m (inset). Bottom: transmission electron microscopy of the cytoplasm of an infected NSC, revealing mature viral particles (arrowheads) and dense bodies (asterisks). Pictures were taken 6 days after infection. Scale bar: 0.5 μ m. (E) Titration of viral particles present in the supernatants of infected NSCs (MOI 10). Supernatants were harvested at different times pi (horizontal axis) and were titrated on MRC5 fibroblasts. Data represent means \pm CI of 2 independent experiments, each being performed in triplicate. Virus strain was AD169 except for panel A (VHL/E).

doi:10.1371/journal.ppat.1005547.g002

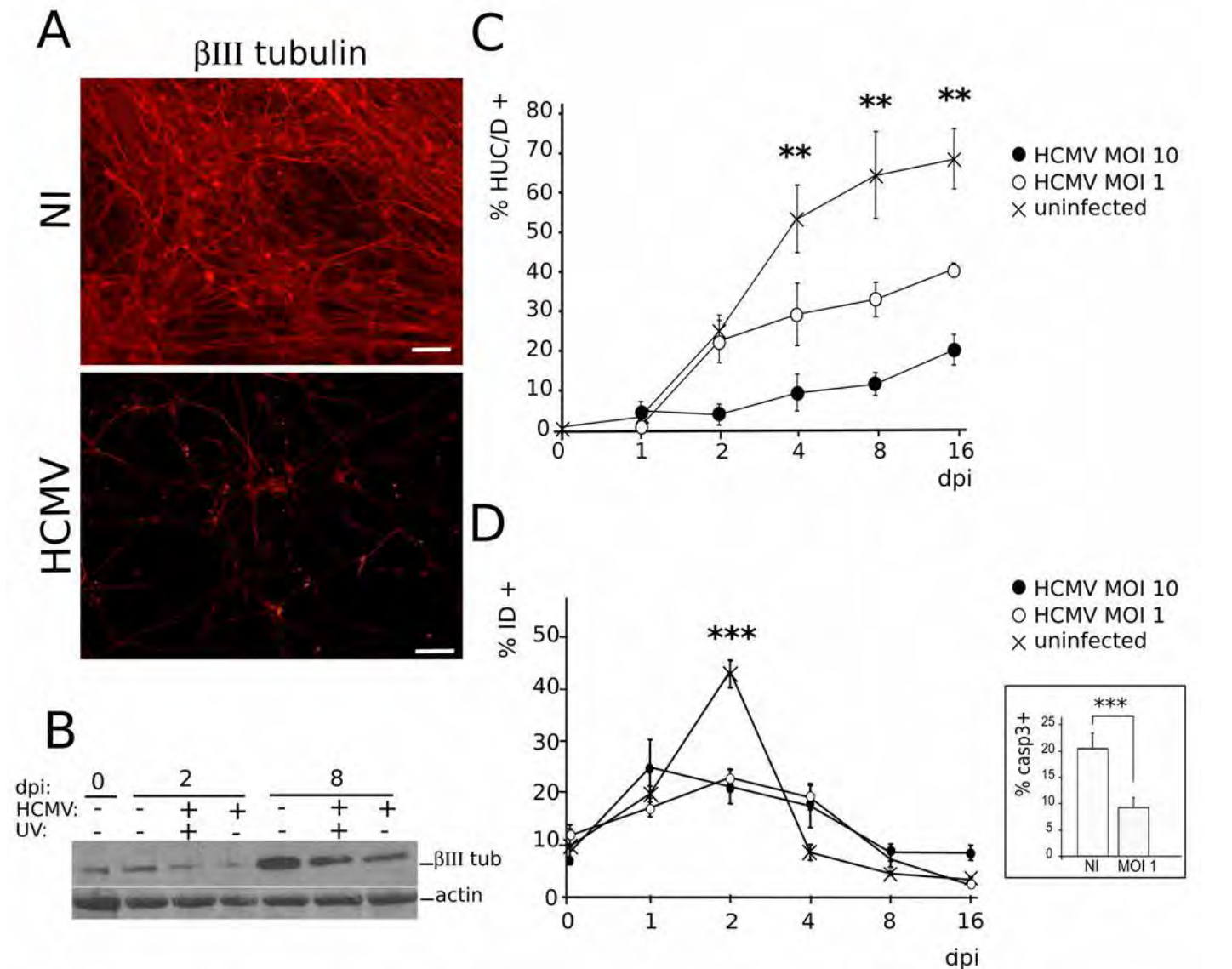


Fig 3. HCMV infection of NSCs impairs neurogenic differentiation in vitro. (A) Representative immunofluorescence analysis of NSCs infected by HCMV at a MOI of 10 (HCMV) and uninfected (NI) NSC cultures, 6 days after the onset of differentiation (i.e., 5 days post infection [dpi]) using a β III tubulin antibody. Scale bar: 50 μ m. (B) Western blot analysis of whole lysates from differentiating NSC infected by live HCMV at a MOI of 10 (HCMV) or by UV-irradiated HCMV (UV), or uninfected controls, showing decreased levels of β III tubulin (β III tub) in the infected cultures. (C) Automated immunofluorescence analysis of differentiating NSC cultures infected or not by HCMV with an HUC/D antibody (HUC/D+). Data represent means \pm CI of 3 independent experiments, each being performed in triplicate. (D) Automated immunofluorescence analysis of differentiating NSC cultures infected or not by HCMV using the cell death marker Image-It Dead (ID). Inset: immunofluorescence analysis using an antibody specific to activated (cleaved) caspase 3 (casp3) of infected (MOI 1, 2 dpi) or uninfected (NI) NSC cultures. HCMV strain was AD169. Data represent means \pm CI of 2 independent experiments, each being performed in triplicate. **: $p < 0.01$, ***: $p < 0.005$.

doi:10.1371/journal.ppat.1005547.g003

cultures (Fig 3C). At this stage, uninfected NSC cultures yielded 52% of neurons, whereas HCMV-infected NSCs generated 29% or 10% of neurons when infected, respectively, at MOI of 1 or 10 ($p < 0.008$). At day 16 pi, uninfected NSC cultures yielded nearly 68% of neurons, while HCMV-infected NSCs generated 39% or 20% of neurons when infected, respectively, at MOI of 1 or 10 ($p < 0.01$). Labeling for Ki67 antigen revealed no change in the proportion of dividing cells in the infected populations as compared to their uninfected counterparts,

indicating that there was no concomitant increase in proliferative NSCs. Finally, we analyzed the cell death rate in infected or uninfected cultures. In control cultures, 44% of cells underwent developmental cell death within the two first days after onset of differentiation (Fig 3D). This event is classically observed during NSCs differentiation. Interestingly, HCMV infection appeared to limit this wave of developmental cell death, since the death rate was strongly and significantly decreased at day 2 pi in infected cell populations (22%; $p < 0.0032$). This was confirmed by analyzing caspase 3 activation 48 h after infection, which revealed a significant decrease in the number of apoptotic cells among infected populations as compared to their uninfected counterparts (9% vs. 20%; $p < 0.0043$, Mann-Whitney test)(Fig 3D).

HCMV infection triggers PPAR γ levels and activity in NSCs

Uninfected NSCs displayed expression of only minute amounts of PPAR γ , as shown by immunofluorescence (Fig 4A, top row) and western blot (Fig 4B) analyses. In contrast, immunofluorescence, western blot and quantitative mRNA analyses revealed high levels of PPAR γ mRNA and protein in HCMV-infected NSCs (Fig 4A–4C). Interestingly, cells with positive PPAR γ staining were much more numerous than IE-positive cells. The PPAR γ staining was nuclear, suggesting that the receptor was in its active form (Fig 4A). This finding prompted us to investigate whether infection enhanced PPAR γ transactivating activity. Activated PPAR γ binds to cognate DNA sequences termed PPAR responsive elements (PPRE). We thus performed luciferase assays using a PPRE-containing, PPAR γ -responsive, luciferase reporter plasmid (pGL4-PPRE-luc), and the corresponding control plasmid (pGL4). Stimulation of uninfected NSCs with rosiglitazone resulted in a small and non-significant increase in PPRE-luc activity (Fig 4D). Infection by live HCMV increased pGL4-driven luciferase activity (ten fold) suggesting a generalized enhanced transcriptional activity in infected NSCs (Fig 4D). More importantly, however, PPAR-specific luciferase activity as assessed by transfection with the pGL4-PPRE-luc reporter plasmid was strongly and significantly increased in infected NSCs (> 43 fold, $p < 0.0019$) (Fig 4D). Incubation of infected NSCs with the specific PPAR γ antagonist T0070907 induced a significant decrease of luciferase activity from PPRE-luc ($p < 0.0026$) (Fig 4D), but no change in luciferase activity from the control plasmid pGL4-luc, further demonstrating specific increased PPAR γ activity in infected NSCs. We next performed chromatin immunoprecipitation (ChIP) assays to examine the ability of PPAR γ , or of whatever dimer containing it, to bind physically to cognate genetic sequences in infected NSCs. We used as a probe a genomic segment located in the 5' promoter region of the *DLK1* gene, which binds PPAR γ [20], and performed ChIP experiment with two different antibodies against PPAR γ (Fig 4E). ChIP revealed a significant increase (> 2 fold, $p < 0.05$) in the level of occupancy of the *DLK1* gene segment by PPAR γ in infected NSCs. Last, Oil red O staining showed that infection was associated with the accumulation of lipid droplets in the cytoplasm of host NSCs, indicative of enhanced lipid metabolism and thus of PPAR γ activity [21] (Fig 4F).

Infected NSCs increase PPAR γ expression levels in uninfected bystander cells

Since a large majority of NSCs showed increased PPAR γ levels in infected cultures, even though they did not show IE expression, we explored the possibility that infected NSCs could exert a positive effect on PPAR γ expression in the surrounding cells. To investigate whether infected NSCs could release soluble mediators able to trigger PPAR γ expression, we purified the supernatants from infected or uninfected NSC cultures, 5 days post infection. We next treated uninfected NSCs with these supernatants (after an ultracentrifugation step to eliminate viral particles) and we analyzed PPAR γ expression two days after this medium change. NSCs

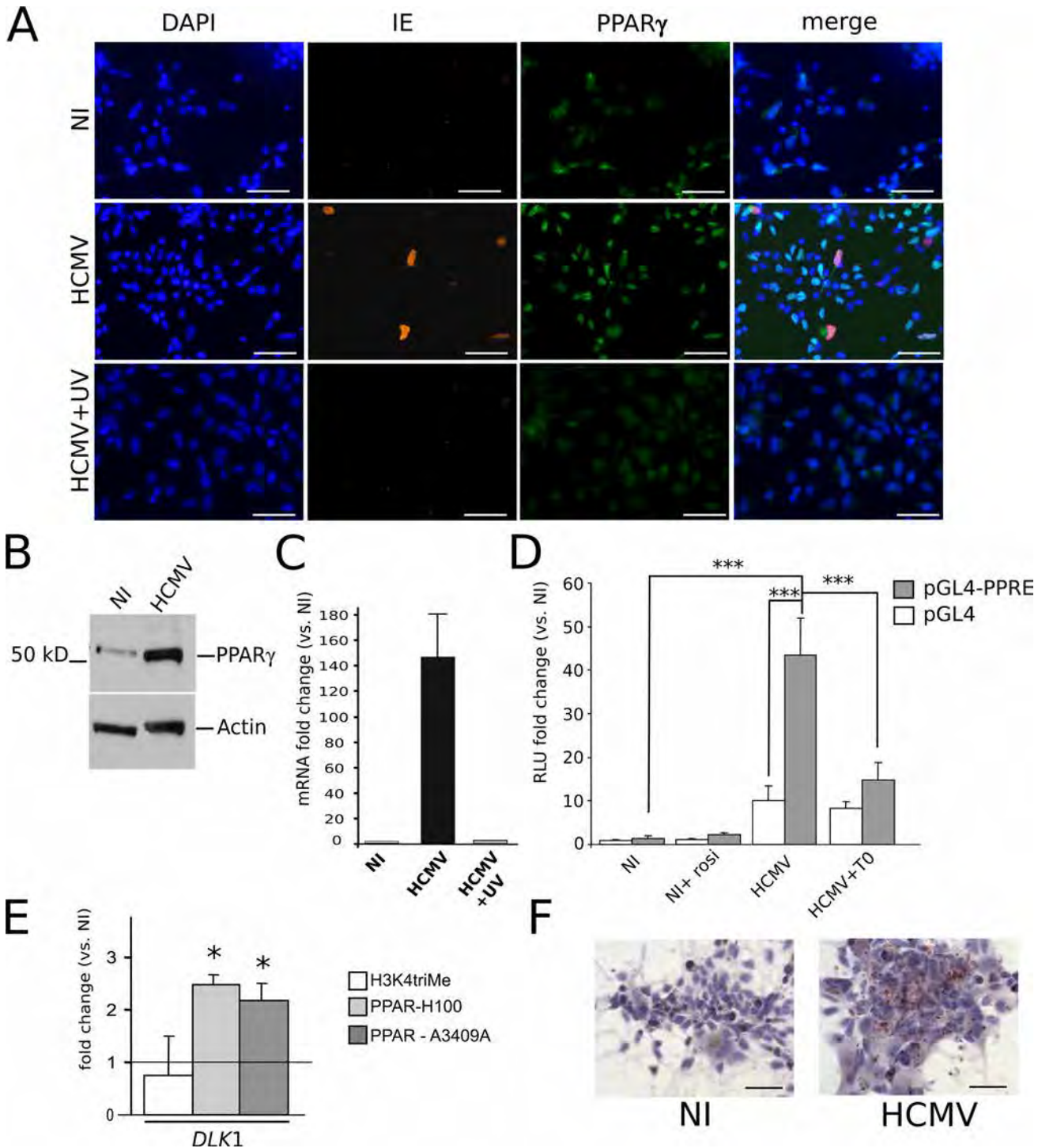


Fig 4. HCMV infection triggers the expression and activity of PPAR γ in NSCs. (A) Immunofluorescence analysis using antibodies specific to IE or PPAR γ showing strong nuclear staining of PPAR γ in NSCs infected by HCMV at a MOI of 10 (HCMV), as compared to non infected NSC cultures (NI) or NSCs infected with UV-irradiated HCMV (HCMV+UV). In merged pictures, double stained nuclei appear cyan (PPAR γ and DAPI) or magenta (IE and DAPI); nuclei stained by DAPI and PPAR γ and IE antibodies appear purple. (B) Western blot analysis showing increased levels of PPAR γ polypeptide in NSCs infected by HCMV (MOI 10) (HCMV) as compared to the uninfected control (NI), at 2 days post infection (dpi). (C) Q-RTPCR analysis showing increased levels of PPAR γ transcript in NSCs infected by HCMV (MOI 10) (HCMV) as compared to the uninfected control (NI, value set to 1), or NSCs infected with UV-irradiated HCMV (HCMV+UV) at 2 dpi. Data represent means \pm CI of 2 independent experiments, each being performed in triplicate. (D) Luciferase reporter assays showing non specific (pGL4) or PPAR γ dependent (pGL4-PPRE) luciferase activity in uninfected NSCs (NI), uninfected NSCs treated with rosiglitazone (NI+rosi), NSCs infected by live HCMV at a MOI of 10, 2 days pi (HCMV), and NSCs infected in the presence of T0070907 (HCMV+T0). Data

represent means \pm CI of 3 independent experiments, each being performed in triplicate. (E) Chromatin immunoprecipitation assays using an antibody against K4-trimethylated histone 3 (H3K4triMe) as the positive control or two different antibodies against PPAR γ (H100 and A3409A), showing increased occupancy by PPAR γ of PPRES within the *DLK1* gene in NSCs infected by HCMV, as compared with uninfected NSCs. Shown are the fold change ratio from infected versus uninfected (NI) cells. Data represent means \pm CI of 2 independent experiments, each being performed in triplicate. (F) Oil red O staining showing numerous lipid vesicles in infected NSC cultures (MOI 10) (HCMV) as compared to uninfected NSCs (NI). Virus strain was AD169. Scale bar: 50 μ m. *: $p < 0.05$; ***: $p < 0.005$.

doi:10.1371/journal.ppat.1005547.g004

treated with supernatants prepared from uninfected cells did not show any increase in PPAR γ levels (Fig 5A). In contrast, NSCs treated with supernatants prepared from infected NSC cultures displayed markedly increased PPAR γ levels, similar to HCMV-infected NSCs. Importantly, almost all cells of the monolayer appeared to be sensitive to exposure to the supernatant prepared from infected NSCs. As expected, no IE-positive cells were detected in the cultures treated with supernatants from infected NSCs, indicating efficient removal of virus particles during the ultracentrifugation step. These results thus show that infected NSCs release soluble mediators that contribute to increase PPAR γ levels in uninfected bystander cells.

Because known PPAR γ activators are polyunsaturated fatty acids [16], we next investigated the hypothetical role of lipids released by the infected NSCs. The total lipid fractions from the supernatants of infected or uninfected NSC cultures were purified by chromatography using C18 columns, followed by desiccation of the extract and solubilization in DMSO. Importantly, such a procedure is incompatible with virion survival, thereby preventing any effect due to virus carry-over. Next we added these lipid extracts to the culture medium of NSCs, at a final concentration of 0.1% (v/v). NSCs exposed to lipids purified from the supernatants of infected cultures displayed a strong increase in PPAR γ levels, in sharp contrast to NSCs exposed to lipids purified from control uninfected culture supernatants (Fig 5B).

Our findings thus show that infected NSCs release soluble mediators able to activate PPAR γ expression in uninfected NSCs, similar to direct infection per se, and that lipid components contribute to this bystander effect.

Production of the PPAR γ agonist 9-HODE is increased in infected NSCs

We next investigated which ligands accounted for PPAR γ activation during HCMV infection of NSC. Natural PPAR γ ligands include 15-deoxy- $\Delta^{12,14}$ prostaglandin (PG) J₂ (15d-PGJ₂), 15-hydroxyeicosatetraenoic acid (15-HETE), 9- or 13-hydroxyoctadecadienoic acid (9/13-HODE) [16]. The precursor of 15d-PGJ₂, PGD₂, as well as 15-HETE and 9/13-HODE are generated by oxidization of arachidonic acid (AA) or linoleic acid (LA) by cyclooxygenase (COX) or 5/15-lipoxygenase (LOX). Release of AA or LA from membrane glycerophospholipids is catalytically driven by calcium-dependent phospholipase A₂ (cPLA₂) activity [22]. Interestingly, during HCMV virion assembly, cellular cPLA₂ is packaged into the viral particle and remains within the tegument of the virions, as an “onboarded” cell-derived cPLA₂ which is required for infectivity [23]. It has been shown that this cell-derived cPLA₂ can be inhibited by treatment of the viral inoculum by the specific cPLA₂ inhibitor methyl arachidonyl fluorophosphonate (MAFP) before infection [23, 24]. Accordingly, we observed that treatment of the inoculum by 50 μ M MAFP abolished IE expression in NSCs (Fig 6A). This suggested a role for this virion-packaged cPLA₂ in the biosynthesis of possible PPAR γ activators derived from polyunsaturated fatty acids (PUFA). To test this hypothesis, we measured levels of candidate PUFA-derived PPAR γ agonists in control NSCs, HCMV-infected NSCs and, as a control, NSCs infected by MAFP-inactivated HCMV. We used a novel, rapid and sensitive method based on high performance liquid chromatography coupled to tandem mass spectrometry (LC-MS/MS) [25] using lysates and conditioned culture media collected at 24 h pi (Fig 6B). Candidate PPAR γ agonists were 9/13-HODE, 15-HETE, and 15d-PGJ₂. We also investigated

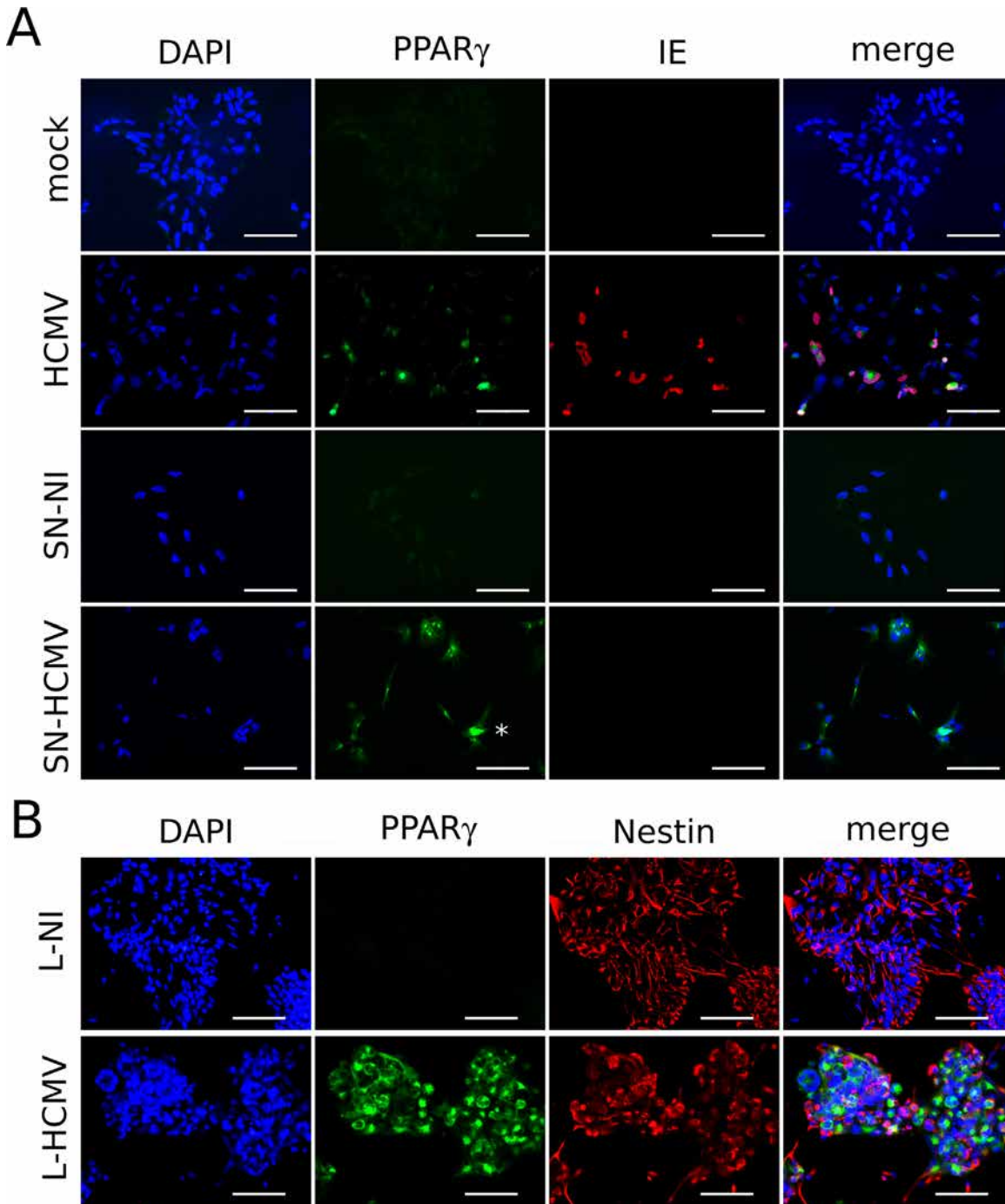


Fig 5. Soluble mediators from infected NSCs trigger the expression of PPAR γ in uninfected NSCs. (A) Immunofluorescence analysis using antibodies specific to IE or PPAR γ showing strong increase in PPAR γ levels in NSCs infected by HCMV (HCMV), or in uninfected NSCs treated with supernatants prepared from HCMV-infected NSC cultures (SN-HCMV), as compared to uninfected NSCs treated with standard growth medium (mock), or NSCs treated with supernatants prepared from uninfected NSC cultures (SN-NI). The asterisk points to a representative cell with PPAR γ nuclear staining. (B) Immunofluorescence analysis using antibodies specific to nestin or PPAR γ showing strong increase in PPAR γ levels in uninfected NSCs exposed to lipid extracts purified from the supernatants of HCMV-infected NSCs cultures (L-HCMV), as compared to NSCs exposed to lipid extracts purified from the supernatants of uninfected NSCs cultures (L-NI). Virus strain was AD169, and the MOI was 10 in all cases. Scale bar: 50 μ m.

doi:10.1371/journal.ppat.1005547.g005

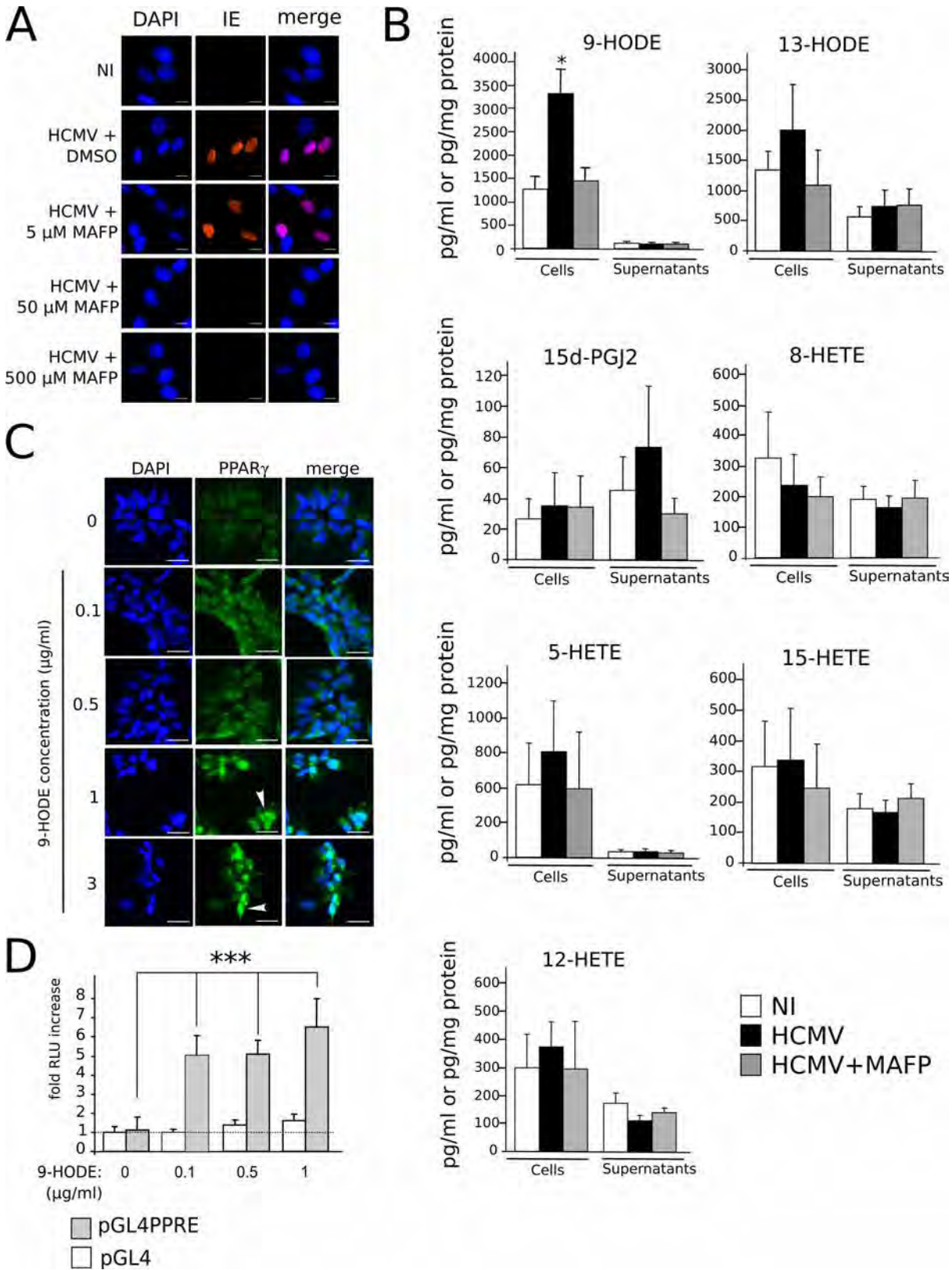


Fig 6. Increased production of PPAR γ agonist 9-HODE in infected NSCs. (A) Immunofluorescence analysis of IE expression, showing that treatment of the HCMV inoculum by the PLA₂ inhibitor MAFP impairs IE expression. NI: uninfected cells in medium containing 50 nM MAFP. (B) LC-MS/MS screening of

PUFA-derived lipids produced in NSCs infected by live (HCMV) or MAFP-treated (HCMV+MAFP) HCMV, or in uninfected NSCs (NI), showing significant increase in 9-HODE levels in infected NSCs (top left). Amounts in supernatants are expressed in pg/ml, amounts in cell lysates are expressed in pg/mg protein. Data represent means \pm CI of a minimum of 5 independent experiments, each being performed in triplicate. *: $p < 0.05$. (C) Immunofluorescence analysis of PPAR γ expression in uninfected NSCs showing increased PPAR γ levels and nuclear translocation (arrowhead). (D) Luciferase assay showing increased PPAR γ activity in NSCs stimulated by 9-HODE. HCMV strain was AD169. Data represent means \pm CI of 2 independent experiments, each being performed in triplicate. ***: $p < 0.005$.

doi:10.1371/journal.ppat.1005547.g006

the amounts of 5/8/12-HETE, although they have not been formally identified as PPAR γ agonists to date. No significant changes were detected in amounts of 15d-PGJ₂, 13-HODE or 5/8/12/15-HETE in infected NSCs or the corresponding culture supernatants (Fig 6B). In contrast, levels of 9-HODE were significantly increased in lysates from HCMV-infected NSCs (> 2.4 fold; $p < 0.029$) (Fig 6B). In uninfected control cell lysates, 9-HODE amounts were detected at 1440.3 pg (4.9 pmol) per mg of total cellular protein, whereas they rose to 3539.8 pg (12 pmol) per mg of protein in infected NSCs. Treatment of HCMV particles with MAFP prior to infection abolished this increase in 9-HODE amounts (Fig 6B), indicating that active virion-packaged cPLA₂ is needed for efficient 9-HODE biosynthesis. Importantly, only low amounts of 9-HODE were found in the conditioned culture supernatants (approximately 0.1 μ g/ml, i.e., 0.3 nM) and no difference was observed in supernatants between infected and control NSCs. We assume that this was likely due to poor stability of 9-HODE in the serum-free medium and/or high cell permeability to 9-HODE resulting in poor abundance in the medium. In any event, our results suggest that HCMV triggers 9-HODE biosynthesis, at least at early stages of infection. Next, we investigated the outcomes of 9-HODE on PPAR γ activity in NSCs, independently from the infectious context. We first carried out immunofluorescence analysis using NSCs stimulated during 24h by a range of 9-HODE concentrations. This analysis revealed a dose-dependent increase in levels of PPAR γ staining in NSCs in response to 9-HODE exposure (Fig 6C). We also evidenced the nuclear translocation of PPAR γ in cells stimulated with 9-HODE at concentrations greater than 0.5 μ g/ml (Fig 6C). We further investigated the effect of 9-HODE on PPAR γ activity by using the more sensitive luciferase reporter assay, which showed significantly increased PPAR γ activity in NSCs stimulated by 9-HODE from 0.1 μ g/ml ($p < 0.0022$) (Fig 6D). Altogether, our results indicate that 9-HODE efficiently activates PPAR γ in NSCs, even outside of the infectious context.

Since PPAR γ enhances IE1/2 gene transcription and HCMV replication [26], these results prompted us to investigate the impact of 9-HODE on HCMV replication in NSCs. To this aim, we infected NSCs at a MOI of 10 in the presence of 9-HODE in the medium. Immunofluorescence analysis revealed that treatment with 9-HODE resulted in significantly increased amounts of cells immunoreactive to an antibody specific to IE, at concentrations from 0.5 μ g/ml ($p < 0.0043$, Mann-Whitney test) (Fig 7A and 7B). Lastly, we carried out an HCMV titration assay. Culture supernatants from infected NSCs stimulated or not by 9-HODE were harvested at 5, 6 and 7 days pi, and were added to the culture medium of MRC5 fibroblasts. The day after, immunofluorescence analysis was performed to assess the number of cells immunoreactive to IE. Titration assay showed that MRC5 cultures incubated with supernatants from NSCs infected in the presence of 9-HODE contained significantly greater number of IE-positive cells (Fig 7C) ($p < 0.01$, Wilcoxon test). Together, these findings show that HCMV replication is more efficient when stimulated by 9-HODE, consistent with the fact that HCMV uses PPAR γ for its replication [26].

PPAR γ activation inhibits NSC neuronal differentiation

We next investigated whether increased PPAR γ activity could play a causative role in the defective neurogenic differentiation of infected NSCs (Fig 8). First, we generated stably transduced NSCs that constitutively and strongly expressed either mouse PPAR γ (NSC-Pg) or

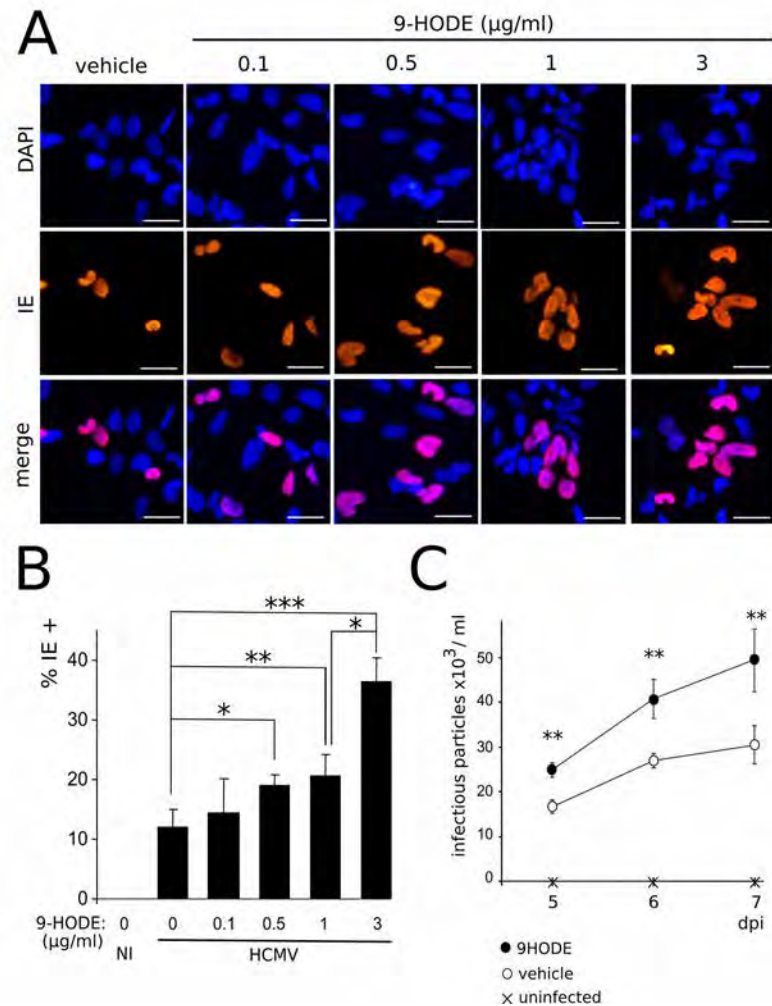


Fig 7. HCMV replication is enhanced by 9-HODE treatment. (A) Representative immunofluorescence results of IE expression in NSCs infected by HCMV at a MOI of 10 in the presence of increasing concentrations of 9-HODE or the vehicle, 48 h pi. (B) Immunofluorescence analysis showing increasing number over time of IE positive NSCs in cultures infected by live HCMV at a MOI of 10 in the presence of increasing concentrations of 9-HODE or the vehicle, 48 h pi. Data represent means \pm CI of 2 independent experiments, each being performed in duplicate. NI: uninfected control. (C) Titration of the viral particles in supernatants of MRC5 fibroblast cultures treated beforehand with supernatants of NSCs infected by live HCMV at a MOI of 10 in the presence of 1 μ g/ml 9-HODE or the vehicle, 48 h pi, or uninfected NSCs. HCMV strain was AD169. Data represent means \pm CI of 2 independent experiments, each being performed in triplicate. *: $p < 0.05$; **: $p < 0.01$.

doi:10.1371/journal.ppat.1005547.g007

eGFP (NSC-GFP) (Fig 8A, top). Next, we carried out in vitro neuronogenesis assays to investigate the level of differentiation of such recombinant NSCs, stimulated or not by the PPAR γ activator rosiglitazone. After seven days of differentiation, we observed that unstimulated NSC-GFP and NSC-Pg both yielded a relatively lower number of neurons (<20%) as compared to wild type NSC cultures, probably because of higher cell passaging, transduction and/or selection (Fig 8A, bottom). No significant difference was observed in the number of neurons generated in NSC-GFP cultures stimulated by the PPAR γ activator rosiglitazone as compared to unstimulated NSC-GFP (Fig 8A, bottom). In contrast, a significantly decreased number of neurons was generated by NSC-Pg upon rosiglitazone stimulation ($p < 0.0006$, Man-Whitney test) (Fig 8A, bottom). We next used wild type NSCs to investigate the impact of the activation

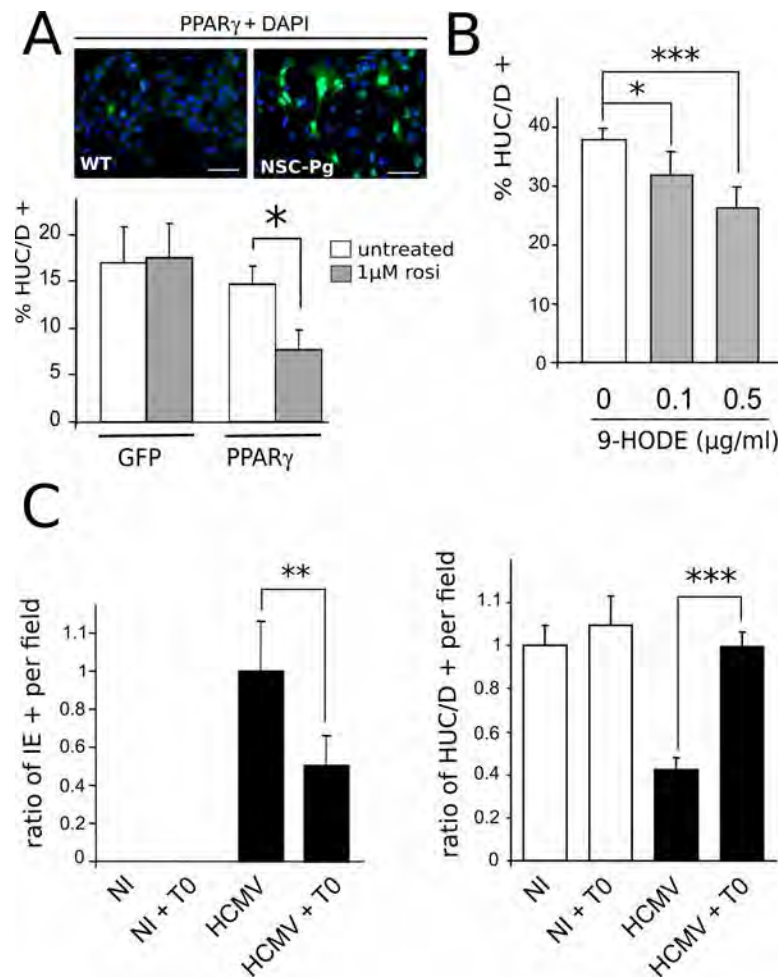


Fig 8. PPAR γ activity negatively regulates neurogenesis from NSCs. (A) Top: Representative immunofluorescence analysis of uninfected NSCs stably expressing PPAR γ (NSC-Pg), using an antibody specific to PPAR γ (green) (right). Wild type uninfected NSC cultures (WT) stained with the same PPAR γ antibody (green) are shown as a control (left). Scale bar: 50 μ m. Bottom: In vitro neurogenesis assay showing significantly decreased number of HUC/D positive neurons generated from NSC-Pg (PPAR) stimulated by 1 μ M rosiglitazone as compared to either untreated NSC-Pg or NSC-GFP (GFP) stimulated or not by rosiglitazone. Data represent means \pm CI of 2 independent experiments, each being performed in duplicate. (B) In vitro neurogenesis assay showing significantly decreased number of HUC/D positive (HUC/D+) neurons generated from wild type NSC treated by 0.1 μ g/ml or 0.5 μ g/ml 9-HODE, as compared to control NSCs. Data represent means \pm CI of 2 independent experiments, each being performed in duplicate. (C) Left: Analysis of the number of IE positive cells in NSCs infected or not by HCMV at a MOI of 1 and cultured in the presence of 10 nM T0070907 (T0) or the vehicle, 4 days pi, showing significantly lower number of IE positive NSCs in cultures with T0. Data are expressed as the ratio relative to the number of IE-positive cells found in untreated, infected NSCs, which was arbitrarily set to 1. Right: In vitro neurogenesis assay showing significantly increased number of HUC/D positive neurons generated from wild type NSC infected by HCMV at a MOI of 1 and treated by 10 nM T0070907, as compared to untreated, infected NSCs. Data are expressed as the ratio relative to the number of HUC/D-positive neurons found in untreated, uninfected NSCs, which was arbitrarily set to 1. Data represent means \pm CI of 2 independent experiments, each being performed in duplicate. Virus strain was AD169. *: $p < 0.05$; **: $p < 0.01$; ***: $p < 0.005$.

doi:10.1371/journal.ppat.1005547.g008

of endogenous PPAR γ in on neuronal differentiation in vitro. We used 9-HODE as the activator because, unlike rosiglitazone, it is able to increase both expression and activity of endogenous PPAR γ in NSCs (Fig 6). We examined the number of HUC/D positive (HUC/D+) neurons generated from NSCs grown in the presence of 9-HODE at 0.1 μ g/ml or 0.5 μ g/ml, or in the presence of the vehicle (ethanol), after seven days of differentiation. 9-HODE

stimulation at concentrations greater than 0.5 $\mu\text{g/ml}$ resulted in strong cytotoxicity within this time period. In the absence of 9-HODE, NSC differentiation yielded 38% HUC/D positive neurons (Fig 8B). Significantly lower rates of differentiation were found in NSCs cultured in the presence of 9-HODE at a concentration of 0.1 $\mu\text{g/ml}$ (31%; $p < 0.017$) or 0.5 $\mu\text{g/ml}$ (26%; $p < 0.002$) (Fig 8B). Together, these findings establish that activated PPAR γ is sufficient to impair neuronal differentiation of NSCs, even without infection. Lastly, we investigated whether pharmacological inhibition of PPAR γ could improve neuronal differentiation in vitro from HCMV-infected NSCs. We carried out neuronogenesis assays with NSC infected by HCMV at a MOI of 1, in the presence of T0070907, a PPAR γ -specific inhibitor. Because of the cytotoxicity of T0070907 on differentiating NSCs, we had to culture them on glass coverslips for no longer than 5 days, before examination of a randomly-selected set of optical fields ($N = 12$) and statistical analysis. When T0070907 was added to the culture medium 3 h pi, it strongly and significantly limited HCMV infection. Indeed, immunofluorescence analysis showed that T0070907-treated NSC populations contained two times less IE immunoreactive cells per field than untreated cultures, at 4 days pi ($p < 0.008$, Mann-Whitney test) (Fig 8C, left). Indeed, untreated NSC cultures contained an average of 11% IE-positive cells (with a 5% confidence interval of 2.9%), whereas the T0070907-treated NSC populations contained an average of 5% of IE-positive cells (with a 5% confidence interval of 1.8%), consistent with our previous observations. This result, consistent with previous studies [26], also confirmed that PPAR γ was efficiently inhibited by T0070907-treatment. As expected, infected NSCs showed defective differentiation and generated almost two times less HUC/D + neurons than uninfected cells ($p < 0.0014$) (Fig 8C, right). Untreated NSC cultures contained from 20% to 40% of neurons per field among the total cell population. Also, uninfected NSCs differentiating in the presence of T0070907 showed no significant change in the abundance of neurons generated as compared to the untreated controls (Fig 8C). In contrast, infected NSCs differentiating in the presence of T0070907 yielded the same number of neurons as compared to the uninfected controls (Fig 8C). These results suggest that treatment by the PPAR γ inhibitor T0070907 can reverse the effects of infection on neurogenic differentiation in vitro, either directly through PPAR γ inhibition, or indirectly through inhibition of viral replication resulting from PPAR γ inhibition.

PPAR γ expression is increased in congenitally HCMV-infected fetuses

To assess the pathophysiological relevance of our experiments using NSCs, we next investigated the expression of PPAR γ in fetal brain samples from aborted fetuses with congenital HCMV infection ($N = 20$) or from control subjects ($N = 4$). The clinical and pathological features are summarized in Table 1.

Gestational ages ranged from 23 weeks to 28 weeks, for cases and controls, so that all case samples could be compared with gestational age-matched controls. We first explored the level of infection in each sample by determining the total number of HCMV-positive cells in each slide, using an antibody specific to IE (Table 1, S2 Fig). No correlation could be established between the number of infectious foci and either gestational age, gender, or severity of the phenotype. Immunohistological analysis of PPAR γ expression revealed PPAR γ immunoreactive cells in the cell-dense, periventricular, brain germinative zone (BGZ) of all HCMV cases (Fig 9A–9E), but in none of the controls (Fig 8H and 8I). PPAR γ staining was nuclear in the majority of cells (Fig 9A–9E), suggesting the presence of the active form of the receptor. We were also able to detect IE-positive cells surrounded by PPAR γ positive cells (Fig 9F), supporting the hypothesis that viral replication enhances PPAR γ expression both in host and neighboring cells. Isolated islets of PPAR γ -positive cells were also detected in discrete lesional areas in the BGZ (Fig 9G). PPAR γ -positive cells were also detected in the ependyma of HCMV subjects (Fig 9D and 9E).

Table 1. Clinical and histopathological summary.

	Reference	GA (weeks)	Gender	Weight (g)	IUGR	μ C	μ G	P μ G	LC	VMG	EPT	CAL	other	IHC (IE+)
Patients	1100117	23	M	800				+		+	+			9
	4752	23	M	520		+	+	+	+	+		+ ^v		36
	3955	23	M	410	+	+		+		+			PVLM	180
	1000239	23	F	530			+				+			3
	4261	23	F	630					+					8
	4099	23	F	430			+	+	+					220
	900188	24	M	527		+	+	+		+				23
	4688	24	M	620		+	+					+ ^{gz, v}		59
	4350	24	F	800										1
	4135	24	F	770			+		+					9
	1100508	25	M	780			+			+				72
	3918	25	F	615	+	+						+ ^{v, c, wm}		47
	1000207	25	M	700			+			+		+ ^{bg}		3
	1300547	27	F	815	+	+	+	+		+	+			301
	4639	27	M	1150			+		+	+	+			8
	4543	27	M	1170										6
	1100328	27	M	1050	+		+	+		+	+			25
	4082	28	F	1150								+ ^{wm, bg, cn}		56
	1100075	28	M	1020				+						5
	4460	28	F	1150		+	+							38
Controls	P1200496 ¹	23	F	470										0
	P1200094 ²	23	F	545										0
	P1200401 ³	25	M	820										0
	P1200243 ⁴	28	F	580	+									0

GA: gestational age based on last menstrual period, IUGR: intra uterine growth retardation, μ C: microcephalia, μ G: microgyria, P μ G: polyesmicrogyria, LC: lissencephaly, VMG: ventriculomegaly, EPT: ependydimitis, CAL: calcifications, PVLM: periventricular leukomalacia, IHC: immunohistochemistry. IHC indicates the total number of IE immunoreactive cells detected per 8- μ m brain section. Locations of calcifications were: (^v) ventricles, (^{gz}) germinative zone, (^c) cortex, (^{wm}) white matter, (^{bg}) basal ganglia, (^{cn}) caudate nucleus. Causes of abortion of control subjects were: (¹) cardiopathy and DiGeorge syndrome, (²) premature rupture of membranes, anamnios and chorioamnionitis, (³) renal failure, (⁴) atrioventricular canal and omphalocele.

doi:10.1371/journal.ppat.1005547.t001

To assess the relative abundance of cells expressing PPAR γ , we counted, for each case, the number of PPAR γ positive nuclei in a series (n = 6) of optical fields within the BGZ (Fig 10). The field size was approximately 10 mm². The number of nuclei in the fields ranged from 453 to 1592, with an average value of 971.3 and a 5% confidence interval of 48.7. Cases showed individual variability in the abundance of PPAR γ expressing cells, ranging from 1.82% to 20.28%, with a mean value of 5.25%. No correlation with gestational age was apparent.

White matter was negative in all infected and control samples (Fig 11). PPAR γ is physiologically expressed in vascular cells and is critical in vascular biology [27]. Accordingly, we observed that endothelial cells in brain vessels were positive to PPAR γ in all infected and control samples (Fig 11). Together, these findings disclose that PPAR γ expression is triggered specifically in the brain germinative areas of cases with congenital HCMV infection.

Discussion

The main result of our study is the identification of PPAR γ activation as a molecular determinant of the pathology induced by HCMV infection in neural precursors, in vitro and

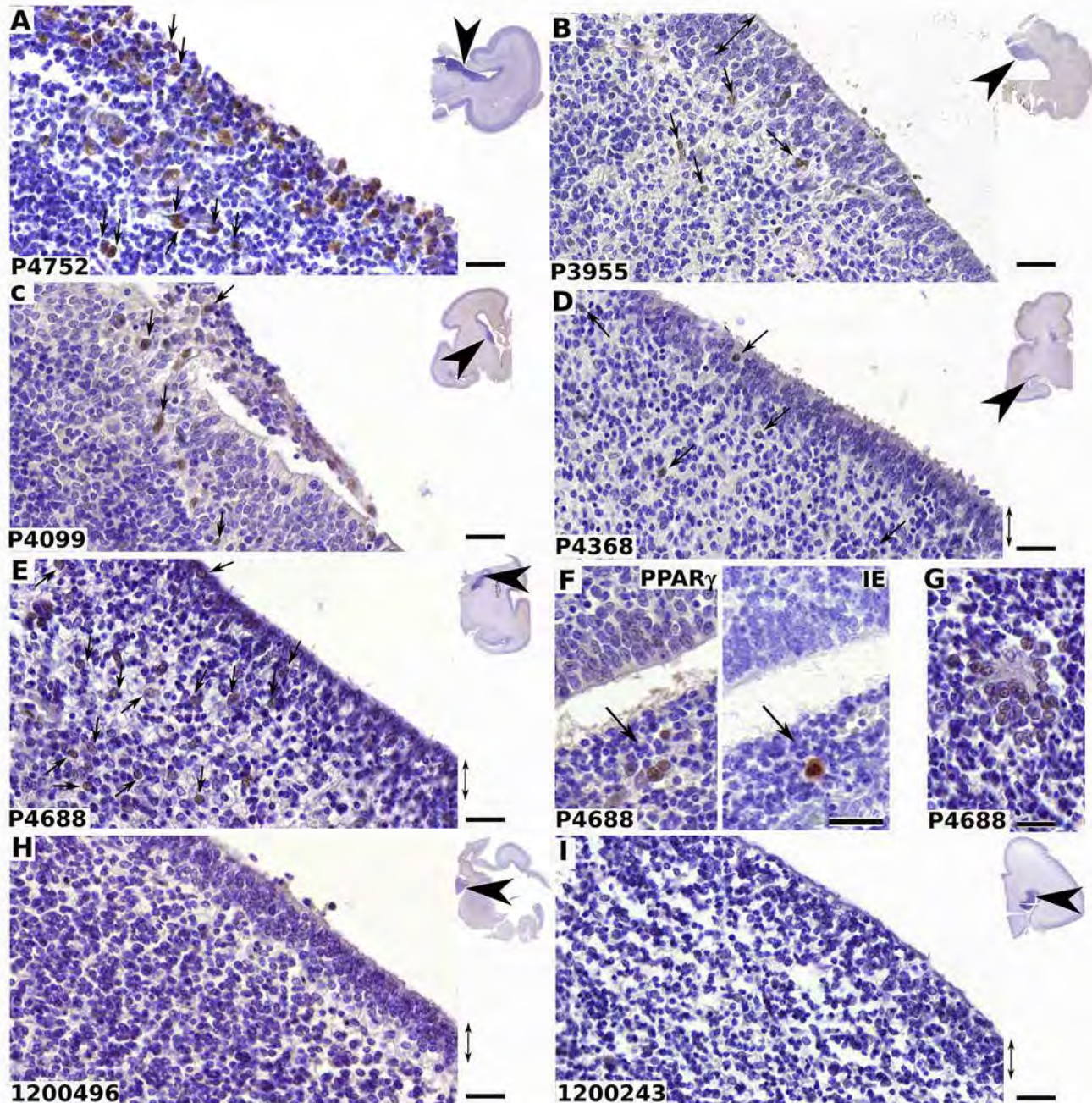


Fig 9. Nuclear PPAR γ expression in germinative zone of HCMV-infected human fetal brains. Shown are representative results of immunohistological staining of brain sections from fetuses infected by HCMV (A-G) or from controls (H, I) using antibodies against PPAR γ (A-E; F, left; G-I) or IE (F, right). The reference number of each donor is indicated at the bottom left of each panel. Clinical details are summarized in [Table 1](#). PPAR γ positive cells (arrows) are detected in the germinative, periventricular, areas and in ependyma (double arrow) in cases, but not in controls. Insets show the localization of the optical field within the brain sections (arrowheads). Note the nuclear localization of PPAR γ (A-G), the presence of PPAR γ positive cell islets surrounding one IE positive cell in two fields from serial sections (F) and clusters of PPAR γ immunoreactive cells around lesional tissue (G). Scale bar: 50 μ m.

doi:10.1371/journal.ppat.1005547.g009

presumably in vivo. Our findings unambiguously demonstrate that HCMV infection causes increased PPAR γ levels and activity, increased biosynthesis of 9-HODE, impaired neurogenesis and enhanced viral replication in NSCs ([Fig 12](#)).

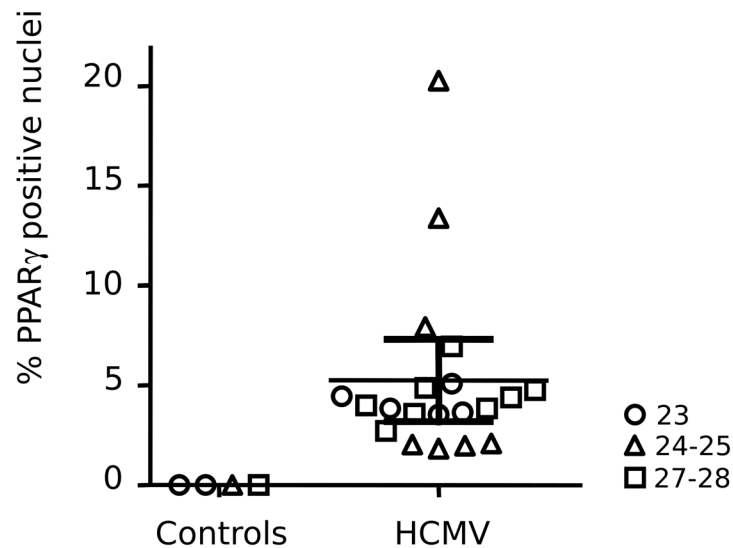


Fig 10. Summary of the immunohistological exploration of PPAR γ expression in HCMV fetal cases and controls. Each symbol represents the mean relative numbers of PPAR γ immunoreactive nuclei in optical fields (n = 6, magnification: x40) found in the brain germinal zone for each individual. Thin horizontal line indicates the average ratio of PPAR γ positive cells found in patients, and thick horizontal lines indicate the corresponding SEM. Symbols indicate gestational age in weeks.

doi:10.1371/journal.ppat.1005547.g010

We here showed that HCMV infection of NSCs associates with increased levels of PPAR γ mRNA and protein, although the changes in levels of transcripts appeared much greater than that of the protein. It is now well documented that protein levels are not systematically

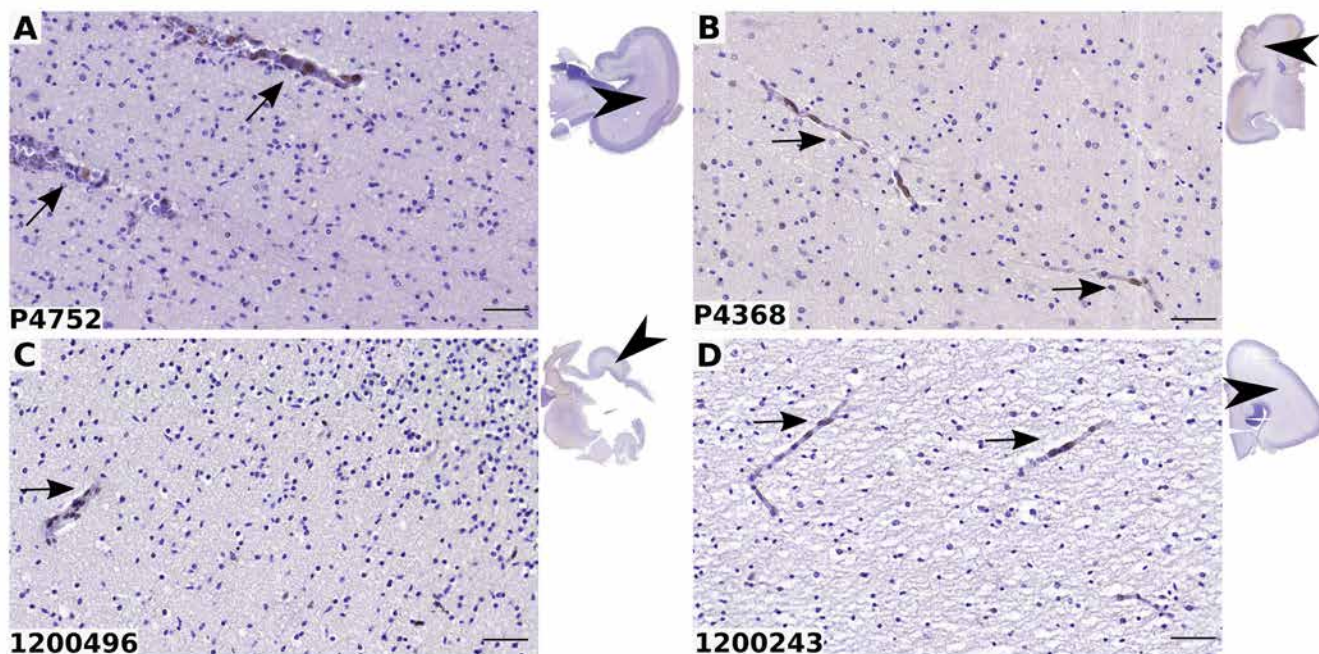


Fig 11. PPAR γ expression is not detected in the white matter of HCMV-infected fetal brains. Shown are representative results of immunohistological staining of brain sections from fetuses infected by HCMV (A, B) or from controls (C, D). The reference number of each donor is indicated at the bottom left of each panel. Clinical details are summarized in Table 1. PPAR γ positive cells (arrows) are detected in the vessels but not in the white matter in patients and controls. Insets show the localization of the optical field within the brain sections (arrowheads). Scale bar: 50 μ m.

doi:10.1371/journal.ppat.1005547.g011

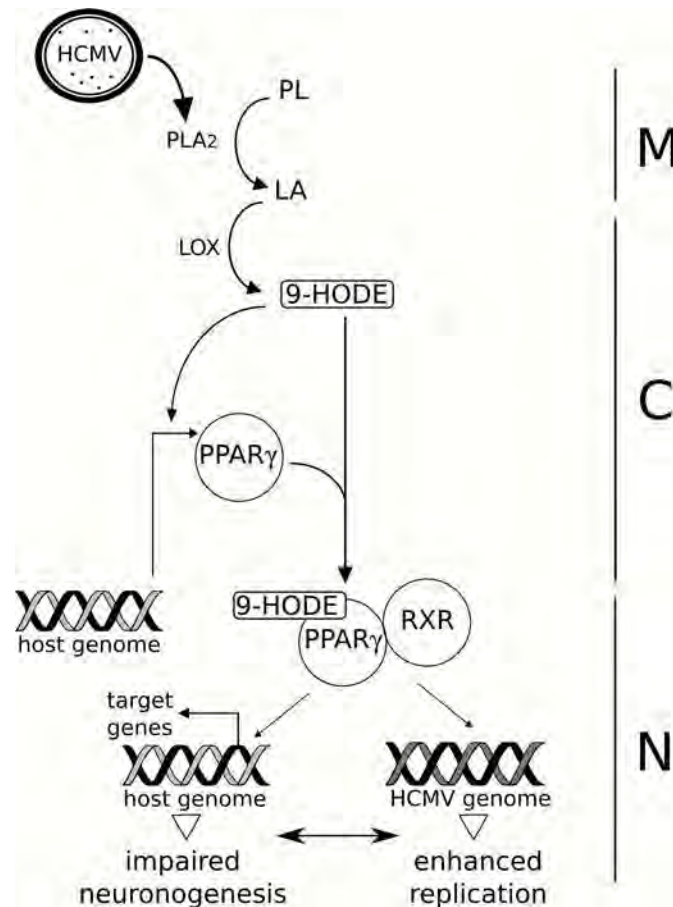


Fig 12. Proposed model for the role of PPAR γ during HCMV infection of NSCs. HCMV particles (HCMV) carry onboarded a cell-derived packaged cPLA2 (oPLA2, dots), which catalyzes the release of linoleic acid (LA) from host membrane phospholipids (PL) upon infection. LA undergoes oxidation driven by 15-lipoxygenase (LOX), which generates 9-HODE. 9-HODE, in turn, increases PPAR γ levels. Activated PPAR γ dimerizes with RXR to regulate the expression of host and viral genomes, resulting in impaired neurogenesis in vitro and enhanced viral replication. M: cell membrane, C: cytoplasm, N: nucleus.

doi:10.1371/journal.ppat.1005547.g012

proportional to mRNA levels [28–30]. The differences in mRNA and protein levels likely arise from the fact that Q-PCR relates to the steady-state levels of transcripts, but does not take into account mRNA stability, protein stability, or translation efficiency.

Enhanced activity of PPAR γ appears to be a common feature of HCMV infection, both in NSCs and cytotrophoblasts [26]. In contrast, PPAR γ activity is decreased in mouse lung tissues infected by H1N1 influenza A virus [31], whereas it increases in macrophages infected by *Mycobacterium tuberculosis* or *Mycobacterium bovis* [32]. The observation that 9-HODE stimulation of uninfected NSCs is sufficient to increase PPAR γ levels agrees with previous studies which revealed that 9-HODE selectively increases PPAR γ gene expression in human U937 monocytic cells [33] or mesangial cells [34]. We have recently reported that 13-HODE and 15-HETE were the PPAR γ agonists secreted by cytotrophoblasts and placenta explants infected by HCMV. In this case, however, no 9-HODE changes were detected [24]. This suggests tissue specificity in the response to HCMV infection with regard to fatty acids metabolism. Strikingly, 9-HODE, 13-HODE and 15-HETE all arise from oxidation of linoleic (9/13-HODE) or arachidonic (15-HETE) acids by lipoxygenase 15 [16]. This route of biosynthesis of PPAR γ activating lipids is alternate to that previously described in human foreskin fibroblasts, where

cyclooxygenase 2 activity catalyzes the biosynthesis of 15d-PGJ₂ from arachidonic acid [35]. Some NSCs showed activated PPAR γ and no IE detectable expression in infected monolayers (Fig 4A). We showed that infected cells exert a bystander effect on PPAR γ expression in uninfected cells through soluble mediators. A significantly increased production of the highly membrane-permeant 9-HODE in infected cells could explain such a bystander effect, although we were unable to detect increased amounts of 9-HODE in the supernatants. One likely hypothesis is that 9-HODE could be present at detectable amounts only in live infected cells and that it would be released upon lysis of infected cells.

Abnormal PPAR γ activity is likely to have multiple outcomes in infected cells and appears as an efficient strategy for HCMV to target simultaneously a number of important functions in the host NSC. PPAR γ is required for IE gene expression and efficient HCMV replication in the host cell [26]. It exerts neuroprotective and anti-inflammatory effects, and regulates the oxidative pathway [36–39]. In particular, PPAR γ is able to trans-repress the activity of NF- κ B, AP-1 and STAT-1 as a response to their activation in the infectious context, resulting in negative modulation of production of the inflammatory mediators iNOS, TNF α , and IL-6 [37]. We report defective neuronal differentiation of NSCs infected by HCMV, in agreement with previous investigations [8, 10, 11, 13, 14]. Previous studies reported that PPAR γ agonists either inhibited [40, 41], promoted [42, 43] or had no effect [44] on neuronal differentiation of uninfected rat or mouse neural progenitors. Our findings, most particularly our assays with singled-out expression of PPAR γ in NSCs or using 9-HODE or T0070907, demonstrate unambiguously that PPAR γ activity inhibits neuronogenesis in NSCs. To rule out the possibility of a receptor-independent effect of T0070907, it would be necessary to knockdown PPAR γ expression in NSCs. Unfortunately, we failed to obtain any viable PPAR γ knockdown using specific siRNA or shRNA vectors. Future experiments using CRISPR/CAS-9 system to invalidate PPAR γ expression in NSCs may help elucidate the role of PPAR γ in neurogenic differentiation.

In the present study, NSCs were generated through early neuroepithelial differentiation of human ES cells by using inhibitors of the TGF β superfamily and a defined medium containing N2 and B27 supplements [19]. This method allows for efficient neural commitment and avoids possible confounding factors such as donor variability, batch-dependent components and feeder cell conditioned media. NSCs displayed a cortical phenotype and no immunoreactivity to non cortical markers [19], which is likely critical since HCMV infection targets cortical areas of the developing brain [7]. A recent study investigated HCMV replication in primitive prero-sette NSCs (pNSCs), which represent a very primitive neural developmental stage [45]. That study revealed that viral replication depends on the differentiation status of the target cells. In that study, neither expression of HCMV early antigens or viral spreading could be evidenced from pNSCs or derived progenitors. We assume that the NSCs used in our work represent a later differentiation stage than the progenitors used in that previous study. pNSCs do not express the radial glia progenitor cell marker GFAP and can be differentiated to S100 β ⁺ NPCs following treatment with FGF2 [45]. This may explain why our NSCs readily supported viral replication, exhibited strong expression of early and late antigens, showed assembled viral particles, and allowed for efficient spreading. Further studies are required to decipher why the initial stages of infection were delayed, with only a minor part of the NSC population becoming IE-positive during the two first days. The reasons for the delayed initial kinetics of infection are unclear, but may be related to either changes in the surrounding cells resulting in increased permissivity, or by possible changes in the virus cycle. Notably, it is presently unclear whether the number of morphologically mature virions detected in infected NSCs by transmission electron microscopy fully correlates with infectivity (Fig 2).

The involvement of PPAR γ in the pathogenesis of congenital HCMV infection is strongly supported by its pattern of expression in HCMV-infected human brain samples. Indeed, all samples from HCMV subjects, and none from control cases, showed PPAR γ immunostaining in the brain germinative zone (BGZ). Moreover, BGZ appeared to be the only brain area with detectable abnormal PPAR γ expression in infected subjects, unlike blood vessels or white matter. So far, only the presence of inclusion bodies [2], but not that of any specific protein, has been reported in brain sections from cases congenitally infected by HCMV. Our findings are consistent with studies in the mouse which identified the germinative subventricular zone as the most sensitive site to infection by murine cytomegalovirus (MCMV) [7, 46]. The critical role of PPAR γ in neurodevelopmental regulation requires fine spatiotemporal tuning of expression and activity [47]. Therefore, we assume that asynchronously increased PPAR γ activity could be deleterious to neurogenesis during HCMV congenital infection. Notably, we observed that the number of PPAR γ expressing cells in brains slices from an infected case was always similar or greater than the number of IE positive cells. This is consistent with the possibility of a bystander effect from infected cells to uninfected cells during congenital infection, such as that observed *in vitro* with NSCs.

In conclusion, NSCs turned out to be an invaluable tool for modeling functional correlates of HCMV infection, and this cell platform may probably be extended to other viral pathologies of the central nervous system. Our findings shed a new light on the pathophysiological bases of the neurological outcomes of congenital HCMV infection and on the role PPAR γ in neural stem cell and developing brain.

Materials and Methods

Ethics statement

Neural stem cells from human embryonic stem cells were used in the frame of a project approved by the French authorities (Agence de la Biomedecine, authorization number SASB0920178S). Collection of brain histological samples was performed in the frame of a project coordinated by Necker Hospital, AP-HP (Assistance Publique-Hôpitaux de Paris). The study was performed in accordance with the French ethical guidelines and was approved by the French authorities (Agence de la Biomedecine, authorization number PFS-15009). Written informed consent was obtained from all study participants prior to sample collection. All samples were anonymized before processing.

Cells, viruses and reagents

NSCs were generated and grown *in vitro* as detailed elsewhere [18]. Briefly, neural tube-like structures containing neuro-epithelial cells were obtained *in vitro* from human embryonic stem (ES) cells by using two inhibitors of the TGF β superfamily (SB431542 and Noggin). Manually isolated colonies were expanded in the presence of EGF, FGF2 and BDNF to obtain NSCs. NSCs were seeded at 100 000 cells/cm² and maintained in growth medium (basal medium) consisting of DMEM/F12/Neurobasal medium (Life Technologies, Grand Island, NY, USA) mixed at a ratio of 1/1/2 (v/v/v) in the presence of N2 and B27 supplements (Life Technologies), 10 ng/ml FGF2, 10 ng/ml EGF, 20 ng/ml BDNF (all from Peprotech, Rocky Hill, NJ, USA). Culture supports were coated first by PBS containing 0.05% poly-ornithine (PO) (Sigma, Saint-Louis, MO, USA) then by PBS containing mouse laminin (1 μ g/cm²) (Roche, Basel, Switzerland). NSC cultures were checked for the absence of mycoplasma (Plasmotest, Invivogen, Toulouse, France). Neuronogenic differentiation was induced by removal of FGF2 and EGF and addition of laminin (2 μ g/cm²) into the medium (differentiation medium)

of low passage (<12) NSCs seeded at 50 000 cells/cm². Culture medium was renewed every two days.

The human immortalized fibroblast line MRC5 (ATCC CCL171, Manassas, VA, USA) was cultured in DMEM containing 10% bovine calf serum (Life technologies).

We used the clinical VHL/E HCMV strain (a gift from C. Sinzger, Tubingen, Germany), at low passage (<8) of amplification in MRC5 cells, and laboratory-adapted AD169 HCMV strain (ATCC VR538). Virus stocks were collected from infected MRC5 fibroblasts when cytopathic effects were >90%. Supernatants were clarified of cell debris by centrifugation at 1,500 \times g for 10 min, ultracentrifuged at 100,000 \times g for 30 min at 4°C, harvested in NSC basal medium, and stored at -70°C until use. Virus titers were determined upon infection of MRC5 cells by serial dilutions of the inoculum followed by immunofluorescence analysis to count the number of nuclei immunoreactive to HCMV Immediate Early antigen (IE) 24 h post infection (pi) (fluorescence unit forming assay). UV irradiation of HCMV particles was performed for 30 min in a closed propylene tube with a Spectrolyne irradiator (EF-140/F) fitted with a BLE-2537S bulb [254 nm] (Spectronics corporation, Westbury, NY). In these conditions, the theoretical radiant energy density is 36 J/cm². After such a treatment, irradiated HCMV virions were still able to infect cells 30 min pi, as checked by immunostaining with an antibody specific to the tegument protein pp65 (Virusys corporation, Taneytown, MD), but the viral genome could not be expressed 24 h pi, as checked by the absence of immunoreactivity to the HCMV Immediate Early antigen (IE).

Antibodies specific to PPAR γ were H-100 (Santa Cruz Biotechnology, Dallas, TX, USA) and A3409A (Abcam, Cambridge, UK). We used primary antibodies specific to HCMV IE (Argene, Verniolle, France), PPAR α (H-74, Santa Cruz Biotechnology), PPAR β (H-98, Santa Cruz Biotechnology), RXR α , β and γ (DN197, Santa Cruz Biotechnology), SOX2 (D6D12, Cell Signaling Technology, Beverly, MA, USA), HUC/D (16A11, Life Technologies), Nestin (10c2, Millipore, Billerica, MA, USA), Class III beta-tubulin (β III tubulin) (TU-20 or ab18207, both from Abcam), cleaved caspase-3 (Cell Signaling Technology), Ki67 (KiS5, Millipore). Secondary antibodies against rabbit or mouse immunoglobulins were conjugated with Alexa-488 or -555 or -647 fluorophores (Life Technologies). No staining was detectable when cells were incubated with the secondary antibodies alone, or with primary and secondary antibodies for which species of origin did not match.

PPAR β synthetic activator was rosiglitazone (1 μ M) (Sigma) and a stimulation time of 2 h was used. PPAR β specific inhibitor was T0070907 (10 nM) (Sigma). Optimal concentrations of rosiglitazone and T0070907 were determined from initial dose-effect experiments using a luciferase PPAR reporter plasmid (as detailed below). Control experiments with rosiglitazone were performed with the vehicle, DMSO. Synthetic 9-HODE was purchased (Cayman, Ann Harbor, MI). Control experiments with synthetic 9-HODE were performed with its vehicle, ethanol.

Cell-derived, virion-packaged cPLA₂ was inactivated as described elsewhere [24]. Viral suspensions were incubated in a volume of 1 ml for 1 h at room temperature in the presence of 50 μ M methyl arachidonyl fluorophosphonate (MAFP; Sigma), ultracentrifuged at 100,000 \times g for 30 min at 4°C, washed twice with phosphate-buffered saline (PBS; Life Technologies) and diluted in culture medium. The working concentration of MAFP (50 μ M) was determined by immunofluorescence analysis using NSCs infected by HCMV particles treated by various doses of MAFP, using an antibody specific to IE. Cell viability was checked by 4'6-diamino-2-phenylindole (DAPI) staining. Control viral suspensions were processed identically after incubation in the presence of the vehicle (DMSO) instead of MAFP. When NSCs were infected with MAFP-treated virus, control uninfected NSCs were cultured in the presence of MAFP at a concentration equivalent to that which would have been obtained without the HCMV particles washes (50 nM).

Transmission electron microscopy

NSC cultures infected by HCMV at a MOI of 10 were fixed in 2% glutaraldehyde in 0.1 M Sorensen phosphate buffer (pH 7.4) for 4 h at 4°C, 6 days post infection. After an overnight wash in 0.2 M phosphate buffer, the cells were post-fixed for 1 h at room temperature with 1% osmium tetroxide in 250 mM saccharose and 0.05 M phosphate buffer, and stained overnight in 2% uranyl acetate. The samples were then dehydrated in a series of graded ethanol solutions and embedded in an Epon-Araldite resin (Embed 812-Araldite 502, Electron Microscopy Sciences, Hatfield, PA). Finally, the cells were sliced into 70-nm thick sections and mounted on 200-mesh collodion-coated copper grids prior to staining with 3% uranyl acetate in 50% ethanol and Reynold's lead citrate. Examinations were carried out on a transmission Hitachi HU12A electron microscope at an accelerating voltage of 75 kV.

Western blot

NSC cultures were seeded in 10 cm² dishes at a density of 100,000 cells/cm². NSCs were infected (MOI 10) or stimulated 16 h after plating, lysed in RIPA buffer containing 50 mM Tris-HCL, pH 7.6; 150 mM NaCl; 0.1% sodium deoxycholate, 0.1% sodium dodecylsulfate, 0.1% NP-40, 1 mM EDTA, and a protease inhibitor cocktail (all from Sigma). Lysates were subjected to SDS-PAGE with 4 to 12% Tris-Tricine gels (Life Technologies). Proteins were blotted onto nitrocellulose membranes (GE-Healthcare, Pittsburgh, PA, USA) using a semi-dry transfer device (Biorad, Hercules, CA, USA). Western blot was performed using Tris-Buffered-Saline (TBS) containing 0.1% Tween-20 as the wash buffer, TBS containing 5% non-fat dry milk and 3% BSA as the blocking buffer, and primary or horseradish peroxidase-conjugated secondary antibodies diluted in blocking buffer. Detection was carried out by using a chemoluminescence kit (Sigma). Analysis was performed with a Chemidoc system (Bio-Rad, Hercules, CA) using conditions when signals were not saturating.

Immunofluorescence

Cells were cultured on coverslips coated with PO and laminin, fixed in 100% methanol for 15 min at -20°C (PPAR staining), or in 4% formaldehyde for 20 min at 4°C, and permeabilized in 0.3% Triton X-100 for 15 min at room temperature (other stainings). Blocking buffer was PBS containing 5% fetal calf serum. Primary antibodies were diluted in blocking buffer and applied overnight at 4°C. Secondary antibodies were diluted in blocking buffer and applied for 1 h at room temperature. The cells were washed three times with blocking buffer, then washed three times with PBS, then counterstained with 1 μ g/ml DAPI (Sigma), washed again three times with PBS and visualized on an DM4000B inverted fluorescence microscope (Leica, Solms, Germany). Image processing was performed using ImageJ software [48].

In vitro neurogenesis assays

For neuronogenesis assays, NSCs were seeded in 0.35 cm² coated culture wells at a density of 15,000 cells per well in differentiation medium and were infected 24 h later. Next, immunofluorescence was carried out at different time points *pi*, using double staining with the antibodies specific to HUC/D and SOX2, and counterstaining with DAPI. The culture plates were analyzed with an automated microscopy device (Cellomics) to count the number of nuclei positive for SOX2 or HUC/D. DAPI staining was used as the primary mask. Cell death assays were performed similarly, using the reagent Image-it dead (Life Technologies).

For neuronogenesis assay in the presence of T0070907, NSCs were installed in differentiation medium on 15 mm² coated glass coverslips in 2.3 cm² wells (150,000 cells/well). The day

after, NSCs were infected or not by HCMV at a MOI of 1. T0070907 (10 nM) was added to the medium 3 h after infection. The medium was renewed everyday. At day 4 pi, immunofluorescence analysis was performed as described above using antibodies specific to HUC/D, SOX2, or IE, and DAPI as a counterstain. Twelve optical fields of each coverslip were visualized on a DM4000B inverted fluorescence microscope, and analyzed using ImageJ. The number of cells immunoreactive to SOX2, HUC/D or IE antibodies was counted manually to exclude dead cells and to resolve cell clusters. Three independent experiments were performed.

Luciferase reporter assays

We used a firefly luciferase (Luc) reporter plasmid based on a pGL4 backbone (Promega, Madison, WI, USA) containing three PPAR responsive elements (PPREs) [26] upstream of the herpes simplex thymidine kinase promoter (pGL4-PPRE-luc). For normalization, we used a promoter-less renilla luciferase normalization plasmid (pRL-null, Promega). NSCs were seeded in 96-well plates at a density of 25,000 cells per well. Transfection of both the reporter and normalization plasmids was performed 16 h after seeding using Genejuice transfection reagent (Millipore), according to the manufacturer's instructions. Cells were infected (MOI 10) or treated with rosiglitazone (1 μ M) or T0070907 (10 nM) during the 24 h following transfection. Last, cell lysis was performed using Cell Culture Lysis Reagent (Promega). Luciferase activity was quantified using a Centro luminometer (Berthold). All assays were done in triplicate and the experiment was repeated twice.

High performance liquid chromatography coupled to tandem mass spectrometry (LC-MS/MS)

LC-MS/MS was performed as detailed elsewhere [26], using HPLC grade methanol, methyl formate, and acetonitrile (Sigma–Aldrich). Deuterium-labeled lipoxin A4 (LxA4-d5), leukotriene B4 (LTB4-d4) and 5- hydroxyeicosatetraenoic acid (5-HETE-d8) (Cayman Chemicals) were mixed at a concentration of 400 ng/ml in methanol and used as the internal standard (IS) solution. In all experiments, NSCs from 10 cm² culture wells were harvested 6 h pi in 0.2 ml of PBS, transferred to lysing matrix A (MP Biomedicals) and supplemented with 5 μ l of IS solution.

Cells were lysed using a spin homogenizer (Fastprep, MP Biomedicals) with 2 cycles of 20 sec at 5,000 rpm. 10 μ l of the lysed cell suspension were added to 200 μ l of 0.1 M NaOH for subsequent protein quantification using a Bradford assay (BioRad). The remaining of the lysate was supplemented with 200 μ l methanol, vigorously shaken, and centrifuged for 15 min at 1,000 x g at 4°C. The supernatants were collected and stored at -80°C until lipid extraction. Lipid amounts from cell lysates were expressed in pg per mg of protein in the lysate. Culture supernatants were collected 6 h pi, supplemented with 300 μ l of ice-cold methanol and 5 μ l of IS solution, clarified by a centrifugation at 1,000 x g for 15 min, and stored at -80°C until lipid extraction. Lipid amounts from supernatants were expressed as pg/ml.

Lipid preparation from all samples was carried out through solid-phase extraction using hydrophobic polystyrene-divinylbenzene resin in dedicated 96-well plates (Chromabond multi96 HR-X 50 mg; Macherey-Nagel). After conditioning of the plate with methanol and sample loading, the plates were washed twice with H₂O/MeOH (90/10, v/v) and dried under aspiration for 15 min. Lipids were eluted with methanol (2 ml), dried under nitrogen, dissolved again in methanol (10 μ l) and transferred to liquid chromatography tubes before LC–MS/MS analysis.

LC-MS/MS analysis was performed using an UHPLC system (LC1290 Infinity, Agilent) coupled to a 6460 triple quadrupole mass spectrophotometer (Agilent Technologies) fitted

with an electro-spray ionization interface. Separation was done at 40°C on a Zorbax SB-C18 column (2.1 mm–50 mm–1.8 μ m) (Agilent Technologies). The compositions of mobile phases A and B were water, acetonitrile (ACN) and formic acid (FA) (75/25/0.1) and ACN, FA (100/0.1), respectively. Compounds were separated with a linear gradient from 0 to 85% B in 8.5 min and then to 100% B at 9 min. Isocratic elution continued for 1 min at 100% B, then 100% A was reached at 10.2 min and maintained to 11 min. The flow rate was 0.35 ml/min. The auto-sampler was set at 5°C and the injection volume was 5 μ l. Source conditions were as follows: negative ESI mode, source temperature = 325°C, nebulizer gas (nitrogen) flow rate = 10 l/min, sheath gas (nitrogen) flow rate = 12 l/min, sheath gas temperature = 400°C and spray voltage = –3500 V. Data were acquired in MRM mode. For each compound, the best conditions of separation and quantification were defined: retention time in minutes (RT), specific Q1/Q3 transition (T) fragmentor (F) and collision energy (CE). Peak detection, integration and quantitative analyses were performed using Mass Hunter Quantitative analysis software (Agilent Technologies). At least three independent experiments were performed, each in triplicate wells.

Generation of recombinant lentiviral vectors and NSCs

We used pWPXL-GFP (Addgene #12257), a lentiviral vector backbone allowing for stable expression of enhanced Green Fluorescent Protein (eGFP) driven by the human EF1 α gene promoter. A MluI- XbaI fragment containing the wild type mouse *Pparg2* cDNA (1626 bp) was excised from a modified pSV Sport PPAR γ 2 plasmid (Addgene #8862) [49] and substituted to the eGFP cDNA into pWPXL-GFP restricted by MluI and SpeI (plasmid pWPXL-Pg). A puromycin resistance cassette containing the gene *Pac* under the control of the human ubiquitin promoter was excised by AscI digestion of the plasmid pSF-CMV-Ub-Puro-SV40 Ori SbfI (Oxford genetics), blunted, and inserted into the blunted KpnI site of pWPXL-Pg and pWPXL-GFP, generating the plasmids plenti-Pg and plenti-GFP.

Lentiviral vectors were generated by transfection of the plasmids pMD2G (Addgene #12259), pCMVR8.74 (Addgene #22036), and plenti-GFP or plenti-Pg into HEK293 cells using calcium phosphate, as recommended by the supplier (Clontech). Lentiviral particles were collected at 24 h and 48 h post transfection, ultracentrifuged at 50,000 \times g for 120 min at 16°C, resuspended in NSC basal medium, and stored at –70°C until use. Recombinant NSCs were generated by transducing cultures by the lentiviral vectors, followed by continuous selection by 1 μ g/ml puromycin. Ectopic expression of eGFP or PPAR γ was checked by immunofluorescence, western blot and oil red O staining.

Oil Red O staining

Uninfected or infected (MOI 10) cells were incubated for 2 h in growth medium in the presence of oleic acid conjugated with BSA (10 μ g/ml), fixed and permeabilized in methanol for 2 min at –20°C and incubated for 10 min with 0.3% Oil Red O diluted in 60% isopropanol. After 30 s of incubation, cells were washed in water and nuclei were counterstained with hematoxylin.

Quantitative RT-PCR

RNA was extracted by using dedicated columns (Qiagen), and 1 μ g was reverse transcribed (RT) with Superscript III (Invitrogen), according to the supplier's recommendations. All quantitative RT-PCR (Q-PCR) assays were based on a SyBr-green based PCR mixture (Roche) using a LC480 system (Roche). All primers pairs were designed using the Primer3 software (<http://frodo.wi.mit.edu/>) [50] and characterized by real-time amplification of a series of cDNA dilutions to determine linearity range and primer efficiency. Primer sequences are

available upon request. All Q-PCR amplifications were done in triplicate and the experiments were performed at least twice. Q-PCRs were carried out according to the MIQE guidelines [51]. Reference gene was GAPDH, as identified by Genorm analysis.

Chromatin immunoprecipitation

Chromatin immunoprecipitation (ChIP) was carried out using the Magnetic ChIP kit (Pierce) following the supplier's recommendations. NSCs were seeded at a density of 100,000 cells / mm² onto 60-mm plates containing one 12-mm glass coverslip, infected after 16 h at a MOI of 10 (AD169 strain), and fixed 48 h post infection. Infection was controlled by immunofluorescence analysis of the cells on the coverslip, using an antibody specific to IE. Sonication of chromatin was performed using a Vibracell device (Bioblock Scientific) and checked by agarose gel electrophoresis. Chromatin was immunoprecipitated with 10 μ g of specific antibody or 10 μ g of unspecific mouse immunoglobulins. One tenth of the immunoprecipitated DNA samples and 5 ng of input DNA samples were subjected to Q-PCR for normalization. Primers specific to *DLK1* were described elsewhere [20].

Immunohistopathological analyses

Brain tissue biopsies were collected from 20 human fetuses aborted electively because of HCMV congenital infection and from 4 controls aborted for non-infectious diseases. Immunohistopathological brain analysis of control and HCMV subjects was performed on 8 μ m sections from paraffin blocks using standard methods, IE antibody, E8 PPAR γ antibody, and Mayer's hematoxylin counterstain, with a Dako Autostainer automated device (Dako, Glostrup, Denmark). Slides were scanned with a Panoramic 250 system (3D Histech, Budapest, Hungary) and analyzed with the Panoramic viewer software (3D Histech). For each patient, 6 optical fields within the brain germinative zone were analyzed. The total number of nuclei in each field was determined using the Fast Morphology plug-in of ImageJ software, with a threshold size of 50 square pixels. When required, cell clusters were resolved manually. The number of nuclei with positive PPAR γ staining in each field was determined manually to exclude endothelial cells when present.

Statistical analysis

Statistical analyses were performed with the StatEL plugin (Adscience) for Excel (Microsoft, Redmond, WA) or GraphPad Prism (GraphPad Software, San Diego, CA), using Kruskal-Wallis test unless indicated. Error bars show 5% confidence intervals (CI).

Accession numbers

PPAR γ gene: *PPARG*, Ensembl ID: ENSG00000132170
Nestin gene: *NES*, Ensembl ID: ENSG00000132688
SOX2 gene: *SOX2*, Ensembl ID: ENSG00000181449
HUC/D gene: Ensembl ID: *ELAVL4*, ENSG00000162374
 β 3-Tubulin gene: *TUBB3*, Ensembl ID: ENSG00000258947
DLK1 gene: *DLK1*, Ensembl ID: ENSG00000185559

Supporting Information

S1 Fig. HCMV infection of growing NSC culture does not alter SOX2 expression. Representative immunofluorescence analysis of NSC cultured in proliferation medium and infected (HCMV, MOI 10) or not (NI) using antibodies against SOX2 and IE, and DAPI

counterstaining, 48h post infection. Arrowheads indicate nuclei remnants from dead cells. Scale bar: 25 μ m.

(TIF)

S2 Fig. IE expression in brain germinative zones from fetus with congenital HCMV infection. Shown are representative results of immunohistological staining of brain sections from fetuses infected by HCMV (top row and bottom row, left) or from control (bottom row, right) using an antibody against IE. Arrowheads denote IE-positive cells. The reference number of each donor is indicated at the bottom right of each panel. Subjects 4752 and 4082 are representative of cases with numerous IE positive cells (top left); subject 4082 is representative of cases with rare IE positive cells (top right). Clinical details are summarized in [Table 1](#). Magnification: x25. Scale bar: 100 μ m.

(TIF)

Acknowledgments

The authors wish to thank the AP-HP staff for collection of samples, Florence Capilla from the US006 INSERM histology facility, Sophie Allart and Astrid Canivet from the imaging facility of Inserm U1043, Bruno Payré and Isabelle Fourquaux from the Electron microscopy facility of Toulouse University–Genopole (CMEAB), and Christine Didier and Fanny Grimal from the Cancer Research Center of Toulouse. I-Stem is part of the Biotherapies Institute for Rare Diseases (BIRD).

Author Contributions

Conceived and designed the experiments: MR XL SC CD. Performed the experiments: MR XL YS SC HM TPB. Analyzed the data: MR XL YS SC JA NC HM CD. Contributed reagents/materials/analysis tools: BR AB BB ML MLV MP CC. Wrote the paper: MR SC DGD CD.

References

1. Cannon MJ. Congenital cytomegalovirus (CMV) epidemiology and awareness. *J Clin Virol*. 2009; 46 Suppl 4:S6–10. PMID: [19800841](#). doi: [10.1016/j.jcv.2009.09.002](#)
2. Cheeran MC, Lokensgard JR, Schleiss MR. Neuropathogenesis of congenital cytomegalovirus infection: disease mechanisms and prospects for intervention. *Clin Microbiol Rev*. 2009; 22(1):99–126, Table of Contents. doi: [10.1128/CMR.00023-08](#) PMID: [19136436](#)
3. Cinque P, Marenzi R, Ceresa D. Cytomegalovirus infections of the nervous system. *Intervirology*. 1997; 40(2–3):85–97. PMID: [9450226](#).
4. Gabrielli L, Bonasoni MP, Santini D, Piccirilli G, Chiereghin A, Petrisli E, et al. Congenital cytomegalovirus infection: patterns of fetal brain damage. *Clinical Microbiology and Infection*. 2012; 18(10):E419–E27. doi: [10.1111/j.1469-0691.2012.03983.x](#) PMID: [22882294](#)
5. Cannon M, Davis K. Washing our hands of the congenital cytomegalovirus disease epidemic. *BMC Public Health*. 2005; 5(1):70. doi: [10.1186/1471-2458-5-70](#)
6. Tsutsui Y, Kosugi I, Kawasaki H, Arai Y, Han GP, Li L, et al. Roles of neural stem progenitor cells in cytomegalovirus infection of the brain in mouse models. *Pathology international*. 2008; 58(5):257–67. PMID: [18429823](#). doi: [10.1111/j.1440-1827.2008.02221.x](#)
7. van den Pol AN, Mocarski E, Saederup N, Vieira J, Meier TJ. Cytomegalovirus Cell Tropism, Replication, and Gene Transfer in Brain. *J Neurosci*. 1999; 19(24):10948–65. PMID: [10594076](#)
8. Luo MH, Hannemann H, Kulkarni AS, Schwartz PH, O'Dowd JM, Fortunato EA. Human Cytomegalovirus Infection Causes Premature and Abnormal Differentiation of Human Neural Progenitor Cells. *J Virol*. 2010; 84(7):3528–41. doi: [10.1128/jvi.02161-09](#) PMID: [20071566](#)
9. Luo MH, Schwartz PH, Fortunato EA. Neonatal Neural Progenitor Cells and Their Neuronal and Glial Cell Derivatives Are Fully Permissive for Human Cytomegalovirus Infection. *Journal of Virology*. 2008; 82(20):9994–10007. doi: [10.1128/jvi.00943-08](#) PMID: [18684829](#)

10. Mutnal MB, Cheeran MCJ, Hu S, Lokensgard JR. Murine Cytomegalovirus Infection of Neural Stem Cells Alters Neurogenesis in the Developing Brain. *PLoS ONE*. 2011; 6(1):e16211. doi: [10.1371/journal.pone.0016211](https://doi.org/10.1371/journal.pone.0016211) PMID: [21249143](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/21249143/)
11. Odeberg J, Wolmer N, Falci S, Westgren M, Seiger A, Soderberg-Naucler C. Human cytomegalovirus inhibits neuronal differentiation and induces apoptosis in human neural precursor cells. *J Virol*. 2006; 80(18):8929–39. PMID: [16940505](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/16940505/)
12. Odeberg J, Wolmer N, Falci S, Westgren M, Sundtröm E, Seiger Å, et al. Late human cytomegalovirus (HCMV) proteins inhibit differentiation of human neural precursor cells into astrocytes. *Journal of Neuroscience Research*. 2007; 85(3):583–93. PMID: [17154414](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/17154414/)
13. D'Aiuto L, Di Maio R, Heath B, Raimondi G, Milosevic J, Watson AM, et al. Human Induced Pluripotent Stem Cell-Derived Models to Investigate Human Cytomegalovirus Infection in Neural Cells. *PLoS ONE*. 2012; 7(11):e49700. doi: [10.1371/journal.pone.0049700](https://doi.org/10.1371/journal.pone.0049700) PMID: [23209593](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/23209593/)
14. Nakamura H, Liao H, Minami K, Toyoda M, Akutsu H, Miyagawa Y, et al. Human cytomegalovirus induces apoptosis in neural stem/progenitor cells derived from induced pluripotent stem cells by generating mitochondrial dysfunction and endoplasmic reticulum stress. *Herpesviridae*. 2013; 4(1):2. doi: [10.1186/2042-4280-4-2](https://doi.org/10.1186/2042-4280-4-2) PMID: [24144363](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/24144363/)
15. Stergiopoulos A, Politis PK. The role of nuclear receptors in controlling the fine balance between proliferation and differentiation of neural stem cells. *Archives of Biochemistry and Biophysics*. 2013; 534(1–2):27–37. doi: [10.1016/j.abb.2012.09.009](https://doi.org/10.1016/j.abb.2012.09.009) PMID: [23044345](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/23044345/)
16. Fournier T, Tsatsaris V, Handschuh K, Evain-Brion D. PPARs and the Placenta. *Placenta*. 2007; 28(2–3):65–76. PMID: [16834993](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/16834993/)
17. Heikkinen S, Auwerx J, Argmann CA. PPAR γ in human and mouse physiology. *Biochim Biophys Acta*. 2007; 1771(8):999–1013. PMID: [17475546](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/17475546/)
18. Boissart C, Nissan X, Giraud-Triboulet K, Peschanski M, Benchoua A. miR-125 potentiates early neural specification of human embryonic stem cells. *Development*. 2012; 139(7):1247–57. PMID: [22357933](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/22357933/). doi: [10.1242/dev.073627](https://doi.org/10.1242/dev.073627)
19. Boissart C, Poulet A, Georges P, Darville H, Julita E, Delorme R, et al. Differentiation from human pluripotent stem cells of cortical neurons of the superficial layers amenable to psychiatric disease modeling and high-throughput drug screening. *Transl Psychiatry*. 2013; 3:e294. PMID: [23962924](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/23962924/). doi: [10.1038/tp.2013.71](https://doi.org/10.1038/tp.2013.71)
20. Couture J-P, Blouin R. The DLK gene is a transcriptional target of PPAR γ . *Biochemical Journal*. 2011; 438(1):93–101. doi: [10.1042/bj20101840](https://doi.org/10.1042/bj20101840) PMID: [21585338](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/21585338/)
21. Schadinger SE, Bucher NLR, Schreiber BM, Farmer SR. PPAR γ regulates lipogenesis and lipid accumulation in steatotic hepatocytes. *American Journal of Physiology—Endocrinology and Metabolism*. 2005; 288(6):E1195–E205. doi: [10.1152/ajpendo.00513.2004](https://doi.org/10.1152/ajpendo.00513.2004) PMID: [15644454](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/15644454/)
22. Six DA, Dennis EA. The expanding superfamily of phospholipase A2 enzymes: classification and characterization. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)—Molecular and Cell Biology of Lipids*. 2000; 1488(1–2):1–19.
23. Allal C, Buisson-Brenac C, Marion V, Claudel-Renard C, Faraut T, Dal Monte P, et al. Human cytomegalovirus carries a cell-derived phospholipase A2 required for infectivity. *J Virol*. 2004; 78(14):7717–26. PMID: [15220446](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/15220446/)
24. Leghmar K, Cenac N, Rolland M, Martin H, Rauwel B, Bertrand-Michel J, et al. Cytomegalovirus Infection Triggers the Secretion of the PPAR γ Agonists 15-Hydroxyeicosatetraenoic Acid (15-HETE) and 13-Hydroxyoctadecadienoic Acid (13-HODE) in Human Cytotrophoblasts and Placental Cultures. *PLoS One*. 2015; 10(7):e0132627. PMID: [26171612](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/26171612/). doi: [10.1371/journal.pone.0132627](https://doi.org/10.1371/journal.pone.0132627)
25. Le Faouder P, Baillif V, Spreadbury I, Motta J-P, Rousset P, Chêne G, et al. LC-MS/MS method for rapid and concomitant quantification of pro-inflammatory and pro-resolving polyunsaturated fatty acid metabolites. *Journal of Chromatography B*. 2013; 932(0):123–33.
26. Rauwel B, Mariame B, Martin H, Nielsen R, Allart S, Pipy B, et al. Activation of peroxisome proliferator-activated receptor gamma by human cytomegalovirus for de novo replication impairs migration and invasiveness of cytotrophoblasts from early placentas. *J Virol*. 2010; 84(6):2946–54. PMID: [20042507](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/20042507/). doi: [10.1128/JVI.01779-09](https://doi.org/10.1128/JVI.01779-09)
27. Duan SZ, Usher MG, Mortensen RM. Peroxisome Proliferator-Activated Receptor-gamma Mediated Effects in the Vasculature. *Circulation Research*. 2008; 102(3):283–94. doi: [10.1161/circresaha.107.164384](https://doi.org/10.1161/circresaha.107.164384) PMID: [18276926](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/18276926/)
28. Greenbaum D, Colangelo C, Williams K, Gerstein M. Comparing protein abundance and mRNA expression levels on a genomic scale. *Genome biology*. 2003; 4(9):117. PMID: [12952525](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/12952525/).

29. Gry M, Rimini R, Strömberg S, Asplund A, Pontén F, Uhlén M, et al. Correlations between RNA and protein expression profiles in 23 human cell lines. *BMC Genomics*. 2009; 10(1):1–14. doi: [10.1186/1471-2164-10-365](https://doi.org/10.1186/1471-2164-10-365)
30. Vogel C, Marcotte EM. Insights into the regulation of protein abundance from proteomic and transcriptomic analyses. *Nature reviews*. 2012; 13(4):227–32. PMID: [22411467](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/22411467/). doi: [10.1038/nrg3185](https://doi.org/10.1038/nrg3185)
31. Gally F, Kosmider B, Weaver MR, Pate KM, Hartshorn KL, Oberley-Deegan RE. FABP5 deficiency enhances susceptibility to H1N1 influenza A virus-induced lung inflammation. *American Journal of Physiology—Lung Cellular and Molecular Physiology*. 2013; 305(1):L64–L72. doi: [10.1152/ajplung.00276.2012](https://doi.org/10.1152/ajplung.00276.2012) PMID: [23624787](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/23624787/)
32. Almeida PE, Carneiro AB, Silva AR, Bozza PT. PPAR gamma; Expression and Function in Mycobacterial Infection: Roles in Lipid Metabolism, Immunity, and Bacterial Killing. *PPAR Research*. 2012; 2012:7. doi: [10.1155/2012/383829](https://doi.org/10.1155/2012/383829)
33. Hampel JK, Brownrigg LM, Vignarajah D, Croft KD, Dharmarajan AM, Bentel JM, et al. Differential modulation of cell cycle, apoptosis and PPAR γ 2 gene expression by PPAR γ agonists ciglitazone and 9-hydroxyoctadecadienoic acid in monocytic cells. Prostaglandins, leukotrienes, and essential fatty acids. 2006; 74(5):283–93. PMID: [16647253](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/16647253/).
34. Negishi M, Shimizu H, Okada S, Kuwabara A, Okajima F, Mori M. 9HODE Stimulates Cell Proliferation and Extracellular Matrix Synthesis in Human Mesangial Cells via PPAR γ . *Experimental Biology and Medicine*. 2004; 229(10):1053–60. PMID: [15522842](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/15522842/)
35. Zhu H, Cong J-P, Yu D, Bresnahan WA, Shenk TE. Inhibition of cyclooxygenase 2 blocks human cytomegalovirus replication. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 2002; 99(6):3932–7. doi: [10.1073/pnas.052713799](https://doi.org/10.1073/pnas.052713799)
36. Bordet R, Ouk T, Petraut O, Gele P, Gautier S, Laprais M, et al. PPAR: a new pharmacological target for neuroprotection in stroke and neurodegenerative diseases. *Biochemical Society transactions*. 2006; 34(Pt 6):1341–6. PMID: [17073815](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/17073815/).
37. Kielian T, Drew PD. Effects of peroxisome proliferator-activated receptor- γ agonists on central nervous system inflammation. *Journal of Neuroscience Research*. 2003; 71(3):315–25. PMID: [12526021](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/12526021/)
38. Széles L, Töröcsik D, Nagy L. PPAR γ in immunity and inflammation: cell types and diseases. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)—Molecular and Cell Biology of Lipids*. 2007; 1771(8):1014–30.
39. Zhao X, Strong R, Zhang J, Sun G, Tsien JZ, Cui Z, et al. Neuronal PPAR γ Deficiency Increases Susceptibility to Brain Damage after Cerebral Ischemia. *The Journal of Neuroscience*. 2009; 29(19):6186–95. doi: [10.1523/jneurosci.5857-08.2009](https://doi.org/10.1523/jneurosci.5857-08.2009) PMID: [19439596](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/19439596/)
40. Katura T, Moriya T, Nakahata N. 15-Deoxy-delta 12,14-prostaglandin J2 biphasically regulates the proliferation of mouse hippocampal neural progenitor cells by modulating the redox state. *Mol Pharmacol*. 2010; 77(4):601–11. PMID: [20086036](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/20086036/). doi: [10.1124/mol.109.061010](https://doi.org/10.1124/mol.109.061010)
41. Wada K, Arita M, Nakajima A, Katayama K, Kudo C, Kamisaki Y, et al. Leukotriene B4 and lipoxin A4 are regulatory signals for neural stem cell proliferation and differentiation. *Faseb J*. 2006; 20(11):1785–92. PMID: [16940150](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/16940150/).
42. Morales-Garcia JA, Luna-Medina R, Alfaro-Cervello C, Cortes-Canteli M, Santos A, Garcia-Verdugo JM, et al. Peroxisome proliferator-activated receptor γ ligands regulate neural stem cell proliferation and differentiation in vitro and in vivo. *Glia*. 2010; 59(2):293–307.
43. Wada K, Nakajima A, Katayama K, Kudo C, Shibuya A, Kubota N, et al. Peroxisome proliferator-activated receptor gamma-mediated regulation of neural stem cell proliferation and differentiation. *The Journal of biological chemistry*. 2006; 281(18):12673–81. PMID: [16524877](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/16524877/).
44. Wang S-h, Guo Y-j, Yuan Y, Li L, Li F-f, Ye K-p, et al. PPAR γ -mediated advanced glycation end products regulate neural stem cell proliferation but not neural differentiation through the BDNF-CREB pathway. *Toxicology Letters*. 2011; 206(3):339–46. doi: [10.1016/j.toxlet.2011.07.026](https://doi.org/10.1016/j.toxlet.2011.07.026) PMID: [21835234](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/21835234/)
45. Belzile JP, Stark TJ, Yeo GW, Spector DH. Human cytomegalovirus infection of human embryonic stem cell-derived primitive neural stem cells is restricted at several steps but leads to the persistence of viral DNA. *J Virol*. 2014; 88(8):4021–39. PMID: [24453373](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/24453373/). doi: [10.1128/JVI.03492-13](https://doi.org/10.1128/JVI.03492-13)
46. Tsutsui Y. Effects of cytomegalovirus infection on embryogenesis and brain development. *Congenital Anomalies*. 2009; 49(2):47–55. doi: [10.1111/j.1741-4520.2009.00222.x](https://doi.org/10.1111/j.1741-4520.2009.00222.x) PMID: [19489954](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/19489954/)
47. Cimini A, Ceru MP. Emerging roles of peroxisome proliferator-activated receptors (PPARs) in the regulation of neural stem cells proliferation and differentiation. *Stem Cell Rev*. 2008; 4(4):293–303. PMID: [18561036](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/18561036/). doi: [10.1007/s12015-008-9024-2](https://doi.org/10.1007/s12015-008-9024-2)
48. Schneider CA, Rasband WS, Eliceiri KW. NIH Image to ImageJ: 25 years of image analysis. *Nature methods*. 2012; 9(7):671–5. PMID: [22930834](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/22930834/).

49. Hauser S, Adelmant G, Sarraf P, Wright HM, Mueller E, Spiegelman BM. Degradation of the Peroxisome Proliferator-activated Receptor γ Is Linked to Ligand-dependent Activation. *Journal of Biological Chemistry*. 2000; 275(24):18527–33. doi: [10.1074/jbc.M001297200](https://doi.org/10.1074/jbc.M001297200) PMID: [10748014](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/10748014/)
50. Koressaar T, Remm M. Enhancements and modifications of primer design program Primer3. *Bioinformatics (Oxford, England)*. 2007; 23(10):1289–91. PMID: [17379693](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/17379693/).
51. Taylor S, Wakem M, Dijkman G, Alsarraj M, Nguyen M. A practical approach to RT-qPCR-Publishing data that conform to the MIQE guidelines. *Methods*. 2010; 50(4):S1–5. doi: [10.1016/j.ymeth.2010.01.005](https://doi.org/10.1016/j.ymeth.2010.01.005) PMID: [20215014](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/20215014/).

3. Perspectives

Effet de l'infection par le HCMV sur la morphologie des neurones

Les neurones différenciés lors de l'infection semblent avoir une morphologie altérée (Fig. 1. C, D) notamment les neurites qui semblent plus épaisses et plus courtes, avec, pour certaines, une extrémité visible et de forme arrondie (Fig. 1. E). PPAR γ pourrait être impliqué dans cette anomalie car son activation corrèle avec une diminution de l'expression de la β 3tubuline (Fig. 1. F-M). Il y a cependant de nombreux autres facteurs qui peuvent agir sur la β 3tubuline. Ces résultats sont préliminaires et demandent donc à être confirmés. Il serait intéressant d'étudier l'effet de l'infection par le HCMV sur la morphologie des neurones, notamment au niveau de la longueur et du nombre de branchement des neurites. En effet, les changements morphologiques, notamment la croissance des dendrites et de l'axone (collectivement appelés neurites), font partie intégrante du processus de différenciation neuronale. La croissance des neurites permet l'établissement des connexions synaptiques au cours du développement. Seules les neurones capables d'établir ces connexions reçoivent des signaux de survie (Read and Gorman, 2009). Les neurites permettent les connexions avec les autres cellules et l'échange de neurotrophines. La croissance des neurites est capitale pour la régénération neuronale, l'apoptose et la dégénérescence des neurones (Hrvoj-Mihic et al., 2013).

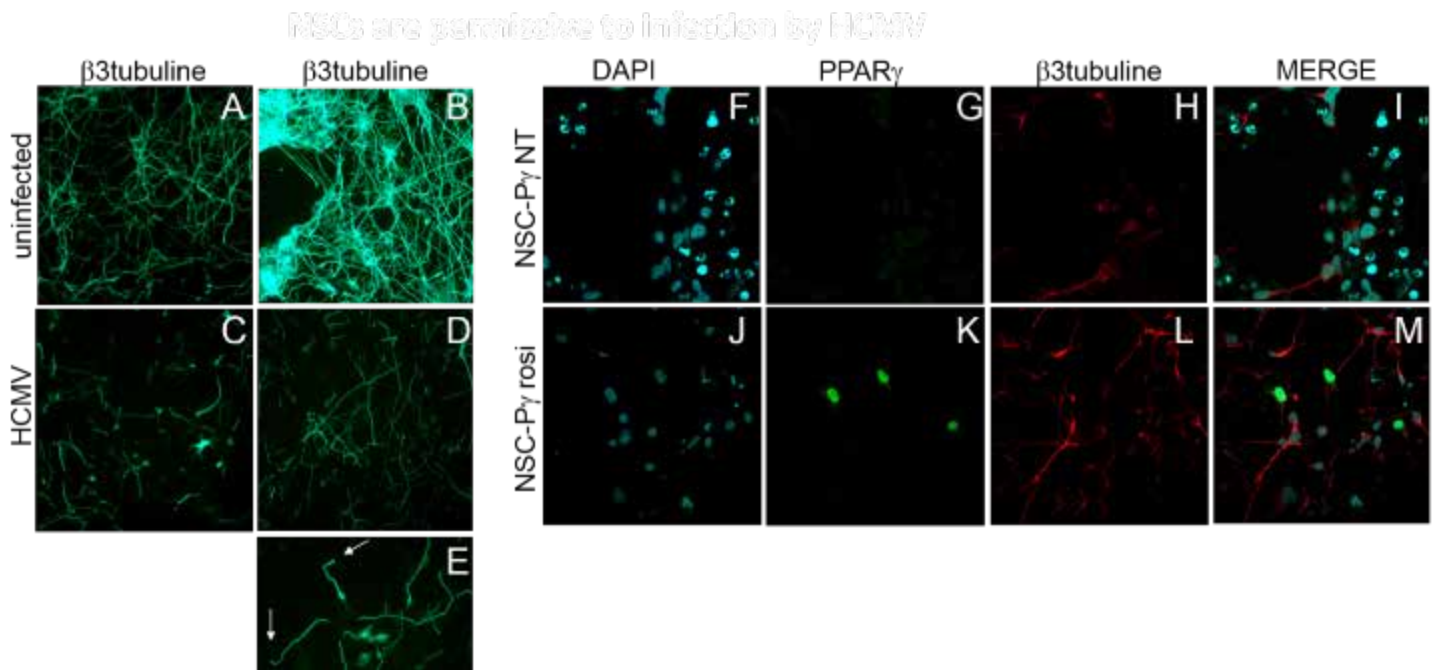


Fig. 1. L'infection par le HCMV altère la morphologie des neurones infectés. Exemples représentatifs de marquages par immunofluorescence en utilisant des anticorps dirigés contre la β 3tubuline (A-E, H, L) et $PPAR\gamma$ (G, K). Ces marquages ont été réalisés sur des neurones différenciés à partir de NSC infectées par le HCMV (MOI 10) 2 jours (C) et 8 jours post-infection (D, E) ou non infectées (A, B) et des NSC- $P\gamma$ traitées à la rosiglitazone (J-M) ou non (F-I). Les cellules ont été marquées 8 jours (F-M) ou 15 jours (A-E) après différenciation. Les flèches blanches (E) indiquent les neurites anormales.

Effet de l'infection par le HCMV sur la différenciation neurale

Nous avons identifié $PPAR\gamma$ comme ayant un rôle clé dans l'inhibition de la neuronogénèse *in vitro*. Il reste désormais à préciser les mécanismes par lesquels $PPAR\gamma$ restreint la différenciation. Il serait effectivement important d'identifier les voies de signalisation et les facteurs impliqués dans cette diminution de la neuronogénèse. Afin de commencer à aborder cette question, nous avons étudié l'état d'activation du facteur STAT3, puisque celui-ci a été associé à une inhibition de la différenciation en neurones (Wada et al., 2006) (Matsuda et al., 1999). De plus, son activation est parfois dépendante de l'activation de $PPAR\gamma$ (Wada et al., 2006) (Nakajima et al., 2001). Nous avons ainsi observé que, dans les NSC infectées par le HCMV, l'inhibition de la différenciation observée était associée à une augmentation de la phosphorylation de STAT3 (Fig. 2. A et B). Cependant, le mécanisme responsable de cette augmentation de phosphorylation de STAT3 lors de l'infection des NSC par le HCMV reste inconnu. En particulier, il ne semble pas que la phosphorylation de STAT3 dans notre système soit liée à la signalisation dépendante du récepteur à l'IL6 (Ihle, 1996) car les NSC infectées par le HCMV produisent de l'IL6 en quantité négligeable (Fig. 2. C)

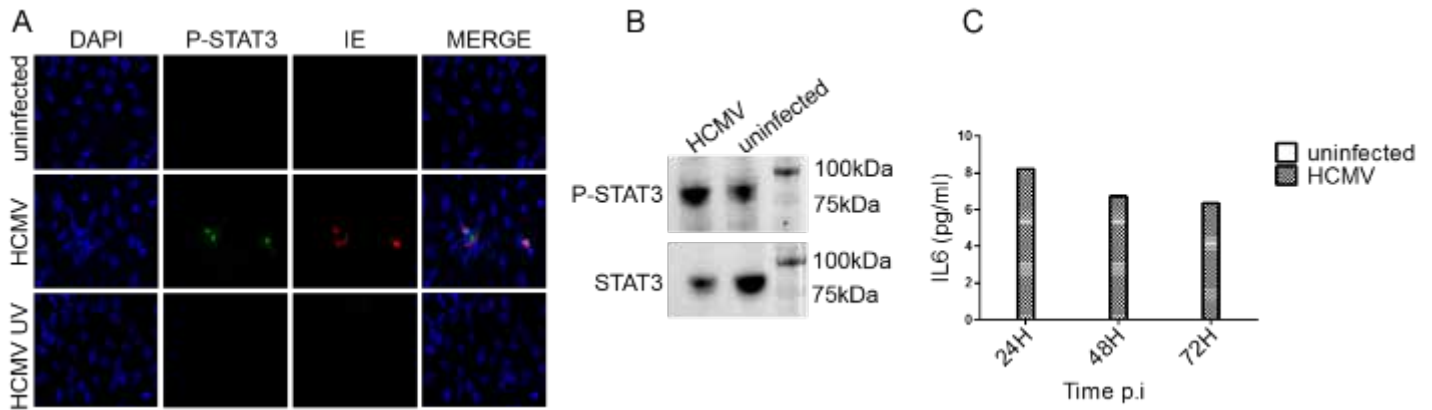


Fig. 2. L'infection des NSC par le HCMV induit une augmentation de la phosphorylation de STAT3 mais pas de sécrétion détectable d'IL6. (A) Exemples représentatifs de marquages par immunofluorescence en utilisant des anticorps dirigés contre IE et P-STAT3 dans des NSC infectées (MOI 10, 48h) traitées ou non aux UV, ou non infectées. (B) Western Blot montrant l'expression des protéines STAT3 totale et P-STAT3 dans les NSC non-infectées ou infectées (MOI 10, 48h). (C) Dosage par CBA montrant les quantités d'IL6 sécrétées dans le surnageant de NSC infectées par le HCMV (MOI 10) 24, 48 et 72h post-infection.

L'infection par le HCMV induisant l'activation de PPAR γ et de STAT3, il serait intéressant dans le futur de chercher s'il y a un lien possible entre ces deux facteurs. Nous pourrions utiliser notre modèle de NSC-P γ afin de savoir si l'activation de PPAR γ en dehors du contexte infectieux est suffisante pour induire la phosphorylation de STAT3.

Nous pourrions également bloquer l'expression et/ou l'activité de PPAR γ dans les NSC infectées (à l'aide d'inhibiteurs pharmacologiques, ou une extinction du gène par des approches de type CRISPR-Cas9 (Niu et al., 2014) (Chen et al., 2015) ou shRNA) afin d'étudier si l'activation de PPAR γ est nécessaire pour cette phosphorylation.

Pour étudier les conséquences de la phosphorylation de STAT3 sur la différenciation neurale lors de l'infection par le HCMV, nous avons utilisé un inhibiteur de l'activation et de la dimérisation de STAT3 (Stattic (Schust et al., 2006)). Cependant, nous ne sommes pas encore parvenus à bloquer l'activation de STAT3 de façon satisfaisante.

Même si PPAR γ est nécessaire et suffisant pour diminuer la différenciation neurale, il existe peut-être d'autres protéines impliquées dans cette inhibition. Nous avons donc cherché les gènes cellulaires modulés par l'infection afin d'identifier d'autres facteurs potentiellement impliqués dans ce mécanisme.

II. L'infection par le HCMV induit une surexpression de LIS1 et DCX

1. Objectifs

Nous nous sommes ensuite intéressés aux gènes cellulaires modulés par l'infection par le HCMV. Nous avons effectué un criblage transcriptomique afin d'identifier ces gènes. Le gène dont l'expression variait le plus fortement était *PAFAH1B1* codant pour la protéine LIS1. Ce gène a été identifié comme étant un des gènes causatifs de la lissencéphalie (Reiner et al., 1993). Le phénotype "lissencephaly-like" est une des séquelles les plus graves associée à l'infection congénitale par le HCMV. Nous avons donc choisi de centrer nos études sur LIS1 et son partenaire fonctionnel DCX.

Nos objectifs étaient :

- 1) D'étudier l'effet de l'infection par le HCMV sur les protéines LIS1 et DCX
- 2) De valider nos observations sur des coupes de cerveaux de fœtus humains (23-28 semaines) infectés *in utero* par le HCMV et présentant de graves anomalies cérébrales.

2. Résultats

Criblage des gènes modulés par l'infection à HCMV

Afin de rechercher les gènes dont l'expression est modulée dans les NSC lors de l'infection par le HCMV, nous avons utilisé un système de criblage par RT-PCR quantitative (RT² Profiler, SABiosciences). Ce système comporte un ensemble de 84 couples d'amorces optimisées pour la qPCR déposés sur plaque de 96 puits. Chaque couple est spécifique d'un gène connu pour son implication dans la neuronogénèse. Nous avons ainsi comparé les niveaux stationnaires d'ARNm de chacun de ces 84 gènes dans les NSC infectées ou contrôles.

Nous avons ensuite sélectionné les gènes dont l'expression était modifiée d'un facteur 3 ou plus parmi ceux dont les niveaux d'ARNm étaient modifiés par l'infection. Sur ce critère, nous avons identifié les gènes suivants : *ACHE*, *APOE*, *ASCL1*, *EGF*, *PAFAH1B1*, *S100A6*. Ces gènes codent respectivement pour l'acétylcholine hydrolase, l'apolipoprotéine E, l'achaete-scute complex homolog 1, l'epidermal growth factor, LIS1 et la protéine S100A6 (Fig. 1.).

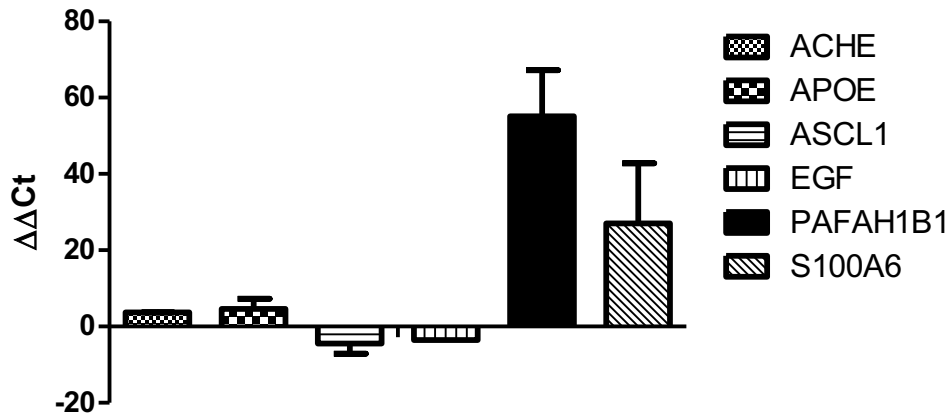


Fig. 1. L'infection des NSC par le HCMV augmente l'expression des gènes *ACHE*, *APOE*, *PAFAH1B1* et *S100A6* et diminue l'expression des gènes *ASCL1* et *EGF*.

Lors de ce crible, nous avons observé que l'expression du gène *PAFAH1B1* (*LIS1*) était augmentée d'un facteur 55 dans les NSC infectées. Nous avons considéré que ce résultat était très intéressant car il est connu que *PAFAH1B1* est un des gènes causatifs de la lissencéphalie. Il nous a donc paru important de d'approfondir nos études sur l'expression de *LIS1*.

L'infection par le HCMV induit une surexpression de *LIS1* et de *DCX* dans les NSC

L'infection par le HCMV augmente sensiblement les niveaux en protéine (Fig. 2. A et B) et en ARNm (Fig. 2. D) de *LIS1*. Nous avons effectué une cinétique en infectant des NSC par le HCMV et en faisant des marquages réguliers afin de d'identifier à quel moment *LIS1* est exprimé. Comme marqueurs d'infections, nous avons utilisé au début de la cinétique un anticorps dirigé contre pp65, car cette protéine virale est détectable dès la pénétration du virus dans la cellule. A partir de 18h post-infection, nous avons utilisé un anticorps dirigé contre la protéine IE qui a été transcrite puis traduite, et qui alors est facilement détectable. *LIS1* est détectée dans les NSC infectées dès 18h post-infection à des niveaux beaucoup plus élevés que dans les contrôles non infectés (Fig. 2.C) Par ailleurs, cette surexpression de *LIS1* est associée à celle de PPAR γ (Fig. 2. A).

Nous nous sommes aussi intéressés au niveau d'expression de *DCX*, qui est le principal partenaire moléculaire de *LIS1*. L'infection par le HCMV augmente aussi le niveau d'expression de *DCX* (Fig. 3. A). Cette surexpression est également associée à celle de PPAR γ (Fig. 3. B).

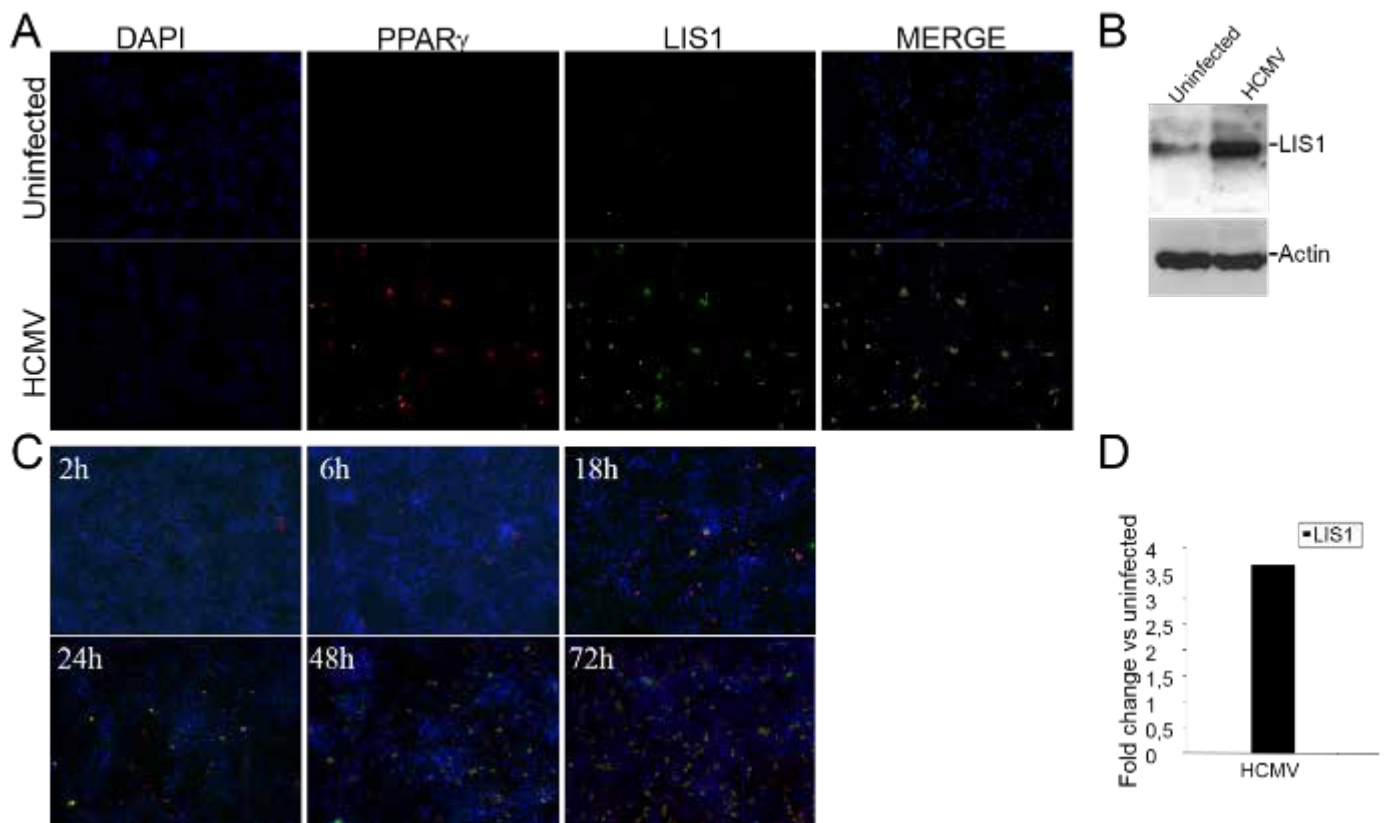


Fig. 2. L'infection des NSC par le HCMV augmente les niveaux d'expression de LIS1. (A) Exemples représentatifs de marquages par immunofluorescence en utilisant des anticorps dirigés contre PPAR γ et LIS1. Ces marquages ont été réalisés sur des NSC non-infectées ou infectées par le HCMV à une MOI de 10 pendant 48h. (B) Western Blot montrant l'expression de la protéine LIS1 dans les NSC non-infectées ou infectées (MOI 10) 48h post-infection. (C) Cinétique d'expression de LIS1 (vert) dans des NSC infectées par le HCMV (MOI 10) marquées pour la protéine pp65 (2 et 6h) ou IE (18-72h) (rouge). Le DAPI apparaît en bleu. (D) Mesure par qPCR-quantitative du rapport de l'expression de l'ARN de LIS1 dans les NSC infectées par le HCMV (MOI 10, 48h) par rapport aux NSC non infectées.

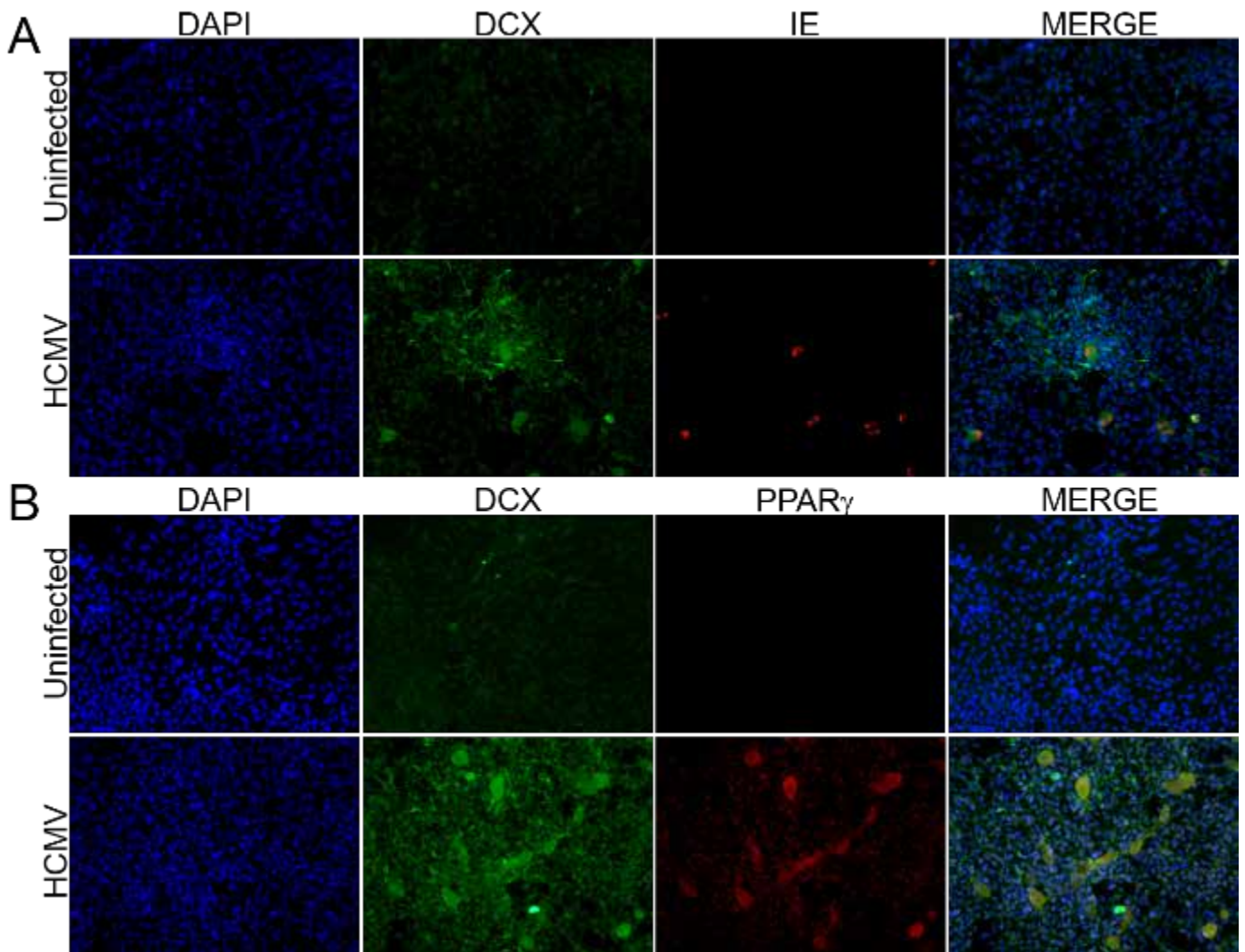


Fig.3. L'infection augmente l'expression de la protéine DCX. Exemples représentatifs de marquages par immunofluorescence en utilisant des anticorps dirigés contre IE et DCX (A) ou PPAR γ et DCX (B). Ces marquages ont été réalisés sur des NSC non-infectées ou infectées par le HCMV à la MOI 10 pendant 48h.

L'expression de LIS1 pourrait être dépendante de l'activité de PPAR γ

LIS1 et PPAR γ sont surexprimés de façon concomitante au cours de l'infection par le HCMV. Pour étudier un lien possible entre LIS1 et PPAR γ , nous avons utilisé les NSC-P γ activées ou non avec la rosiglitazone. Dans ces cellules, l'activation de PPAR γ par la rosiglitazone induit une surexpression de LIS1 (Fig. 4 A).

Cette augmentation de l'expression de LIS1 est également retrouvée au niveau de l'ARNm, bien que plus faiblement (Fig. 4 B). Ce résultat suggère un lien possible entre l'activité de PPAR γ et LIS1, même en dehors du contexte de l'infection par le HCMV. Nous avons donc émis l'hypothèse que le gène *PAFAH1B1* puisse être une cible de PPAR γ .

Pour étudier un potentiel lien fonctionnel entre PPAR γ et *PAFAH1B1*, nous avons recherché des éléments de réponse à PPAR γ (PPRE) dans le gène *PAFAH1B1*. Pour cela, nous avons effectué un alignement de séquences inter-espèces à partir du début (5' non transcrit) du gène *PAFAH1B1* jusqu'à l'exon 2, à l'aide des outils Vista (Frazer et al., 2004). Cette étape a permis d'identifier 13 segments non codants conservés.

Nous avons ensuite recherché des PPRE potentiels dans ces séquences conservées du gène à l'aide du programme PPRE finder (Rauwel et al., 2010). Nous avons identifié huit séquences contenant des PPRE potentiels dans l'exon 1 et dans la région 5' non transcrite (nommés Ecr1 à 8) ainsi que cinq dans l'intron 1 rassemblés en cluster (nommés Ecri1 à 5) (Fig. 4 C). Nous avons dans un premier temps sélectionné l'Ecr6 pour nos études, car il présentait le plus haut niveau de conservation. Nous avons également inclus les Ecri1 à 3, qui présentent aussi un haut niveau de conservation et apparaissent rassemblés au début de l'intron 1. Ce cluster nous est apparu comme une meilleure cible que les PPRE isolés. En effet, un cluster d'éléments de réponse est souvent plus efficace pour réguler l'expression d'un gène qu'un élément de réponse seul. De plus, il est fréquent que le premier intron d'un gène contienne des séquences réponses régulatrices de l'expression de ce gène (Birney et al., 2007).

Nous avons alors voulu évaluer si PPAR γ était physiquement présent sur ces régions candidates dans les cellules infectées. Par immunoprécipitation de chromatine (ChIP), à l'aide d'un anticorps dirigé contre PPAR γ , nous avons observé que dans les NSC infectées, le nombre de copies de l'Ecri3 liés à PPAR γ était trois fois plus élevé que dans les contrôles non infectés. Il ne semble pas avoir de différences dans les autres séquences testées (Fig. 4 D). Il est donc possible que l'infection des NSC par le HCMV active PPAR γ et que cette activation conduise directement à la surexpression de LIS1.

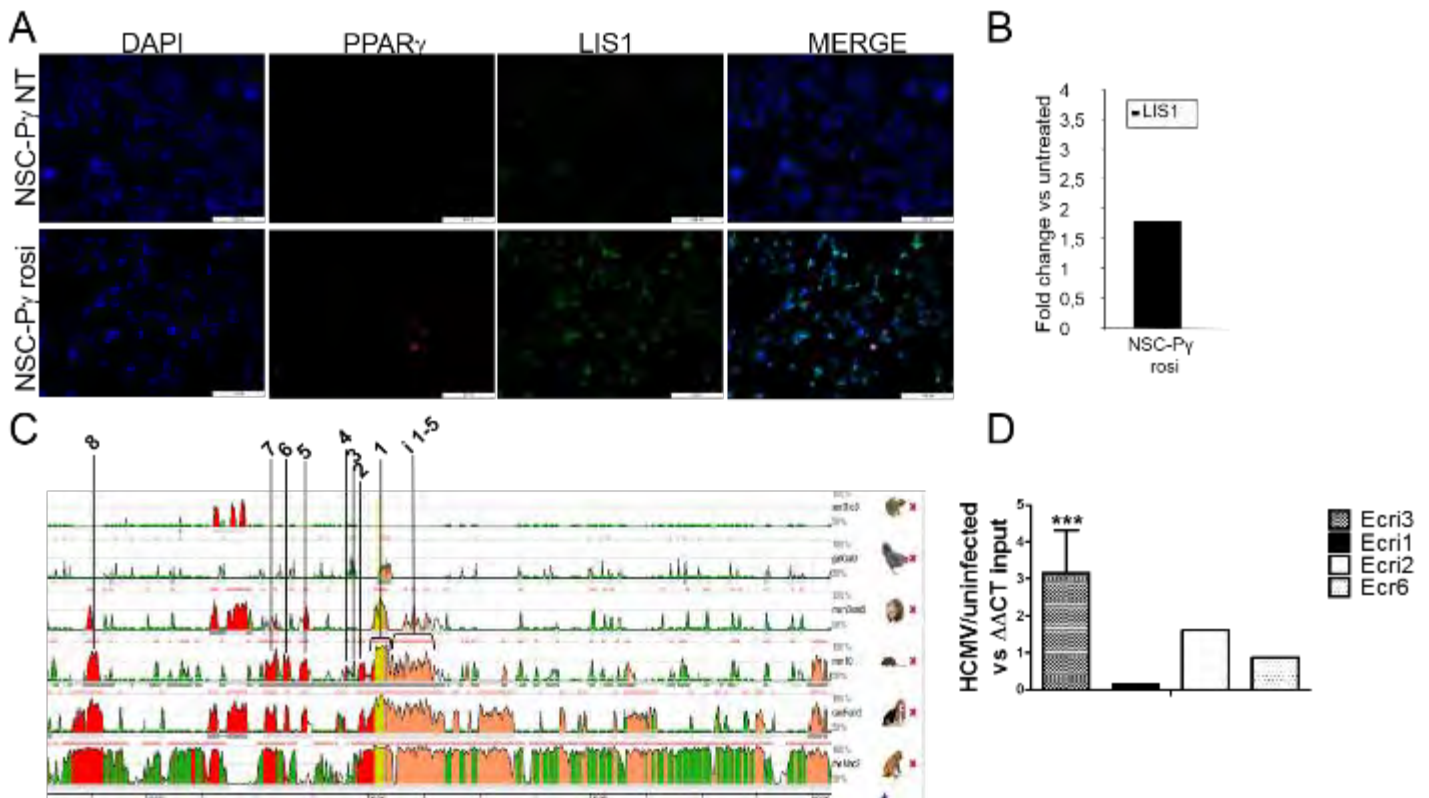


Fig. 4. L'activation de PPAR γ pourrait induire l'expression de LIS1. (A) Exemples représentatifs de marquages par immunofluorescence en utilisant des anticorps dirigés contre PPAR γ et LIS1 dans des NSC exprimant le gène PPAR γ de façon ectopique (NSC- P γ) traitées à la rosiglitazone 1 μ M (rosi) ou non traitées (NT). (B) Rapport mesuré par qPCR-quantitative de l'expression de l'ARN de LIS1 dans les NSC exprimant le gène PPAR γ de façon ectopique (transduction lentivirale) traitées avec 1 μ M de rosiglitazone par rapport aux non traitées. (C) Alignement inter-espèces d'une partie du gène LIS1. La hauteur des pics indique la précision de l'alignement et la couleur le niveau de conservation de la séquence (rouge : très conservée, vert : peu conservée). Une recherche de PPRE potentiels a été effectuée sur cet alignement grâce au logiciel PPRE-Finder. Les PPRE identifiés sont indiqués de 1 à 8 dans l'exon 1 (en jaune) et la région 5' non transcrite, et de i-1 à 5 dans l'intron 1. (D) Immunoprécipitation de chromatine (ChIP) en utilisant un anticorps dirigé contre PPAR γ . Le graphique représente l'occupation par PPAR γ de 4 PPRE sur le début de la séquence du gène LIS1 dans des NSC infectées par HCMV (MOI 10, 48h) par rapport à celle des NSC non infectées.

L'infection par le HCMV induit une surexpression de LIS1 et DCX chez le fœtus

Nous avons voulu valider nos résultats *in vivo*. Pour cela, nous avons utilisé des coupes de cerveaux de fœtus humains contrôles ou infectés par le HCMV. Les informations cliniques sur ces échantillons sont résumées dans la table 1 de l'article Rolland et al, 2016. Nos prélèvements provenaient d'interruptions médicales de grossesse (IMG) réalisées à 23 (Fig. 5. A, D-F, I-K; Fig.6. A-E), 27 (Fig. 5. B, G, L) ou 28 (Fig. 5. C, H, M) semaines.

Nos résultats préliminaires suggèrent que l'infection *in utero* par le HCMV pourrait provoquer une forte expression de LIS1 (Fig. 5.) et de DCX (Fig. 6) comparativement aux contrôles.

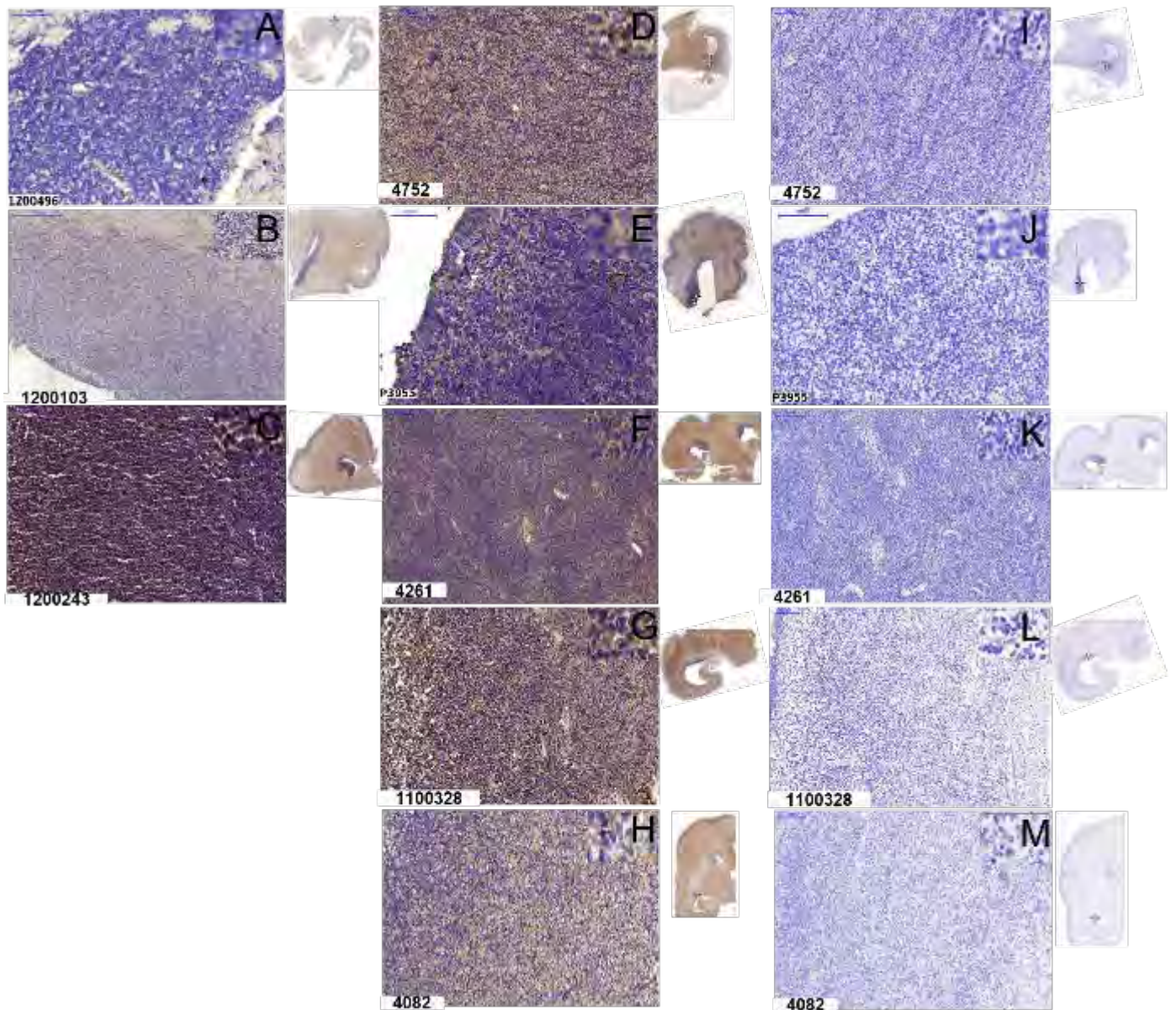


Fig.5. L'infection par le HCMV induit une surexpression de LIS1 *in utero*. Exemples représentatifs de marquage immunohistologiques à partir de cerveaux de fœtus infectés par le HCMV (D-M) ou contrôle (A-C) en utilisant un anticorps dirigés contre LIS1 (A-H) ou l'anticorps secondaire seul (I-M).

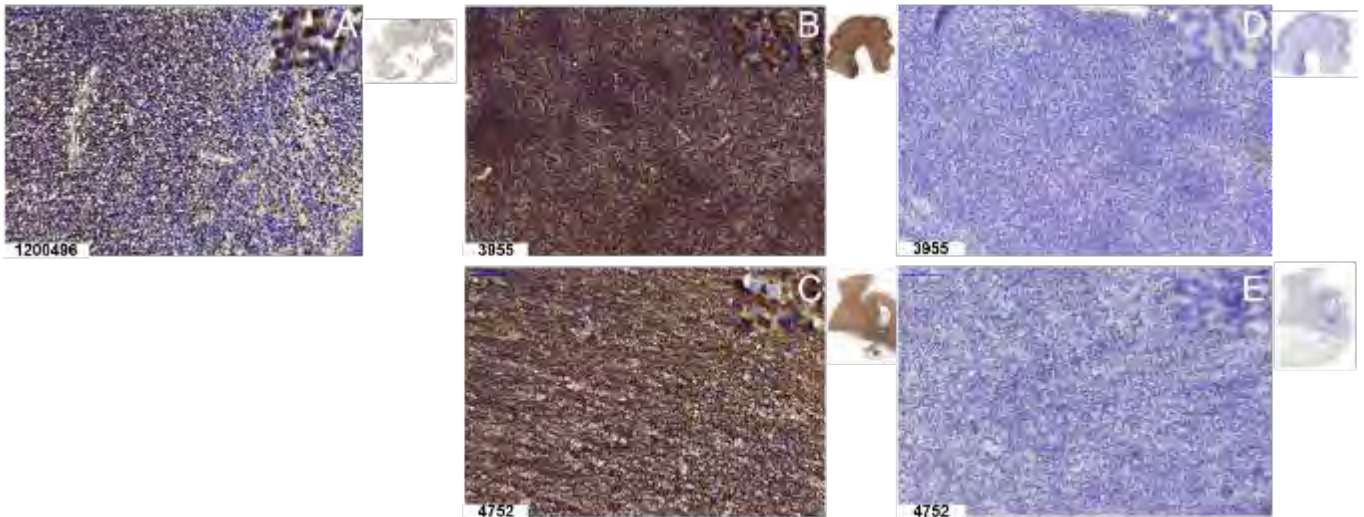


Fig.6. L'infection par le HCMV induit une surexpression de DCX *in utero*. Exemples représentatifs de marquage immunohistologiques à partir de cerveaux de fœtus infectés par le HCMV (B-E) ou contrôle (A) en utilisant un anticorps dirigés contre DCX (A-C) ou l'anticorps secondaire seul (D,E).

Conclusions

Dans leur ensemble, nos résultats suggèrent que l'infection par le HCMV augmente l'expression de LIS1 *in vitro* et *in vivo*. Cette surexpression semble dépendante de l'activité de PPAR γ . L'expression de DCX, protéine partenaire de LIS1, est également augmentée *in vitro* et *in vivo* par l'infection.

DISCUSSION ET PERSPECTIVES

L'infection par le HCMV a-t-elle un effet sur la morphologie des neurones ?

Dans la première partie de nos résultats, nous avons constaté que les neurones différenciés lors d'une infection par le HCMV semblent avoir une morphologie altérée.

LIS1 a un rôle majeur dans la morphologie des progéniteurs et des neurones, en particulier lors de la formation des neurites (Sasaki et al., 2000). L'altération de l'expression de LIS1 conduit à des anomalies de morphologie des progéniteurs et des neurones (Tsai et al., 2005). Comme l'infection par le HCMV augmente considérablement l'expression de LIS1 (Fig. 2 et 5), il serait intéressant d'étudier l'impact de la surexpression de LIS1 sur la morphologie des progéniteurs et surtout des neurones. La dérégulation de l'expression de LIS1 pourrait être responsable de perturbation de la croissance des neurites.

Nos résultats suggèrent que la protéine DCX est également surexprimée dans les NSC lors de l'infection par le HCMV. Or, il a été montré que la surexpression de DCX induit une stabilisation des microtubules et une inhibition de la croissance des neurites durant la différenciation des progéniteurs dans les cellules PC-12. Cette surexpression a aussi été observée chez un patient, associée à un phénotype de lissencéphalie et une croissance des neurites complètement bloquée (Shmueli et al., 2001). Dans les cellules COS-7, la surexpression de DCX perturbe l'organisation des microtubules et/ou modifie leur morphologie (Sapir et al., 2000)

La surexpression de DCX lors de l'infection pourrait donc avoir un impact sur la morphologie des NSC et neurones.

PPAR γ est-il responsable de la surexpression de LIS1 ?

Nos résultats préliminaires suggèrent que l'activation de PPAR γ est suffisante pour induire l'expression de LIS1 (Fig. 4). Par manque de temps, nous n'avons pas encore pu compléter ce travail. Il serait intéressant de savoir si l'activation de PPAR γ est nécessaire à la surexpression de LIS1. Il faudrait, pour cela, bloquer l'activation de PPAR γ dans les NSC infectées et étudier l'expression de LIS1. Pour cela, nous avons essayé, sans succès jusqu'à présent, de produire une lignée de NSC transduites avec un lentivirus contenant un gène dominant négatif de PPAR γ . Nous avons également utilisé des siRNA et shRNA dirigés contre PPAR γ sans résultats concluants. Nous pourrions utiliser des inhibiteurs de PPAR γ , ou produire une lignée de NSC avec une expression de PPAR γ diminuée de façon stable par la méthode CRISPR-Cas9.

Si PPAR γ semble suffisant pour induire l'expression de LIS1 dans les NSC infectées, nous ne savons pas si cet effet est direct ou indirect. Cette surexpression peut être due à plusieurs mécanismes : augmentation de la transcription, augmentation de la stabilité protéique, inhibition de la dégradation... Or, PPAR γ est un facteur de transcription. Notre hypothèse privilégiée est donc que PPAR γ pourrait lier des éléments de réponse spécifiques dans le gène *PFAH1B1* et augmenter ainsi directement la transcription de LIS1.

En effet, nous avons montré que le nombre de copies de l'Ecri3 liées à PPAR γ était trois fois plus élevé dans les NSC infectées que dans les contrôles. Il reste cependant à montrer qu'Ecri3 possède bien une activité « enhancer ». Nous souhaitons évaluer cette activité grâce à des tests d'activité luciférase. Dans cette hypothèse, nous pourrions aussi étudier si Ecri3 peut se trouver à proximité physique du promoteur de *PFAH1B1* (capture de conformation de chromosome (Dekker et al., 2002)).

Quelles sont les conséquences fonctionnelles de la surexpression de LIS1 ?

De nombreuses études montrent que LIS1 joue un rôle crucial dans la migration cellulaire. L'absence ou la surexpression de LIS1 ont été décrites comme entraînant des problèmes de motilité interkinétiques (McKenney et al., 2010).

De plus, une partie des anomalies du développement cérébral observé chez les enfants infectés in utero font penser à des anomalies de migration des cellules neurales (Cannon, 2009). Dans un premier temps, il serait intéressant d'étudier l'effet de l'infection par le HCMV sur la migration des NSC. Nous souhaiterions notamment effectuer des tests de migration en deux et trois dimensions, en utilisant des approches comme les tests de cicatrisation ou la culture en chambres de Boyden. Comme il a été démontré que les NSC migrent en réponse au gradient de chimio-attractant VEGF et PDGF (Forsberg-Nilsson et al., 1998) (Liu et al., 2011), ces molécules pourraient aussi être utilisées dans ces approches. Nous pourrions également utiliser une méthode nommée « intraslice implantation system » qui permet d'étudier la migration des NSC humaines en les injectant dans des coupes de cerveaux murins nouveau-nés maintenus en histoculture (de Bouard et al., 2002). Dans un second temps, il faudrait étudier l'effet de la surexpression de LIS1 sur la migration des NSC. Nous prévoyons de produire des NSC transduites avec un lentivirus, qui surexprimeraient LIS1 de manière ectopique et nous permettraient d'étudier son effet en dehors du contexte infectieux.

La surexpression de LIS1 et/ou de DCX peut-elle induire le phénotype « lissencephaly-like » chez le fœtus ?

La surexpression de LIS1 entraîne de lourdes conséquences phénotypiques. Elle induit une mauvaise orientation des fuseaux mitotiques et interfère avec la progression en mitose (Faulkner et al., 2000). La surexpression de LIS1 dans d'autres cellules que les neurones conduit à une accumulation périphérique des microtubules dans un mécanisme dit « neuron-like » (Smith et al., 2000). Chez la souris, la surexpression de LIS1 durant le développement cérébral affecte la migration radiale et tangentielle. La migration neurale est largement diminuée et les cerveaux de ces souris sont beaucoup plus petits que la moyenne. Dans ce modèle, il a été observé un nombre très important de cellules apoptotiques, une réduction de la polarité des cellules et une organisation cellulaire altérée dans la VZ (Bi et al., 2009).

PAFAH1B1 est un des gènes causatifs de la lissencéphalie. Un phénotype « lissencephaly-like » est observé chez les enfants infectés *in utero* par le HCMV. Notre hypothèse est que la dérégulation de l'expression du gène de LIS1 lors de l'infection pourrait causer ce phénotype. La lissencéphalie est habituellement causée par une diminution de l'expression de LIS1 due à des mutations « perte de fonction » du gène. Cependant il existe des patients qui surexpriment LIS1 à cause de duplications ou triplications du gène (Bi et al., 2009). DCX est également un des gènes causatifs de la lissencéphalie. Une mutation gain de fonction a déjà été identifiée chez un patient atteint de lissencéphalie (Shmueli et al., 2001).

L'infection fœtale par le HCMV pourrait ainsi induire ce phénotype caractéristique d'une maladie monogénique. La question reste cependant ouverte de comprendre pourquoi cette séquelle n'est observée que dans les cas graves d'infection.

Un cas similaire a récemment été rapporté. *SLITRK6* est un des gènes responsable de la surdité neurosensorielle héréditaire (OMIM#609681). La surdité neurosensorielle est la conséquence la plus fréquente de l'infection congénitale par le HCMV. Or, une étude récente a démontré que la protéine virale IE2 sous-régulait l'expression du gène *SLITRK6* dans des progéniteurs neuronaux lors de l'infection *in vitro* (Liao et al., 2016).

Quelles finalités médicales ?

La prise en charge de l'infection fœtale par le HCMV reste controversée. La principale difficulté est d'établir au bon moment et avec précision le pronostic de gravité des séquelles avant la naissance.

Les facteurs pronostiques sont principalement dérivés d'échographies prénatales ou d'IRM du cerveau fœtal mais les séquelles cérébrales peuvent apparaître tard lors de la grossesse voire n'être confirmées que bien après la naissance (Benoist et al., 2008). La thrombocytopenie fœtale et les taux sériques de β 2microglobuline élevés dans le sang du fœtus ont été proposés comme marqueurs pronostiques précédant le développement des lésions cérébrales (Fabbri et al., 2011). Or, ces marqueurs doivent être obtenus par choriocentèse, une procédure fortement invasive (Romanelli et al., 2008). Une étude récente a réalisé l'analyse du peptidome issu du fluide amniotique de fœtus infectés ou non par le HCMV. Grâce à la combinaison de la quantité de 34 peptides contenus dans le liquide amniotique des fœtus infectés, cette étude permet un pronostic des enfants symptomatiques à la naissance avec une sensibilité de 89% et une spécificité de 75% (Desveaux et al., 2016). Même s'il apparaît donc possible d'établir un pronostic de la gravité des séquelles de l'enfant, ce pronostic nécessite cependant de réaliser une amniocentèse, une technique invasive qui comporte un risque de déclencher une fausse couche (0,5 à 1% des cas). Il n'y a pas, à l'heure actuelle, de marqueurs connus permettant de faire un pronostic fiable des séquelles de l'enfant à partir du sang maternel (technique non invasive).

L'infection du placenta par le HCMV déclenche une production importante de s-FLT1 (soluble receptor fms-like tyrosine kinase) qui peut être dosé dans le sang maternel (Maidji et al., 2010). Des travaux de l'équipe montrent que l'infection du placenta par le HCMV diminue également la sécrétion de protéine plasmatique placentaire de type A (PAPP-A) (Rauwel et al, en soumission).

Le dosage de la PAPP-A dans le sang maternel est déjà utilisé pour le dépistage de la trisomie 21 (Bonne et al., 2016) (Bonne et al., 2016). Dans le cadre de l'infection par le HCMV, le dosage de la PAPP-A et/ou de s-FLT1 pourraient être des indicateurs de l'infection placentaire et permettre un pronostic des anomalies de placentation. Cependant, rien n'indique à ce jour que ce dosage puisse permettre de faire un pronostic des atteintes fœtales.

Nos résultats montrent que le niveau d'expression de PPAR γ dans le cerveau est indicatif de l'infection cérébrale du fœtus. La détection d'un marqueur représentatif de l'expression de PPAR γ dans le cerveau fœtal pourrait permettre un pronostic de l'atteinte cérébrale du fœtus. Nous avons identifié le ligand physiologique de PPAR γ produit lors de l'infection des NSC par le HCMV : le 9-HODE.

Le dosage du 9-HODE circulant dans le sang maternel est possible, ce test pourrait être réalisé dans un but clinique de manière facile et non coûteuse (Viola et al., 2016). Cependant le niveau de 9-HODE n'est pas spécifique de l'infection des NSC fœtales par le HCMV, ce n'est donc pas un bon marqueur pronostic. Un criblage approfondi du sécrétome des NSC infectées et/ou dans lesquelles PPAR γ est activé pourrait permettre d'identifier *in vitro* une ou des molécules solubles susceptibles d'être associées à la sévérité des séquelles *in vivo*. L'identification de tels candidats pourrait ouvrir la voie à une évaluation de leurs niveaux au cours de grossesses à risque.

Conclusion

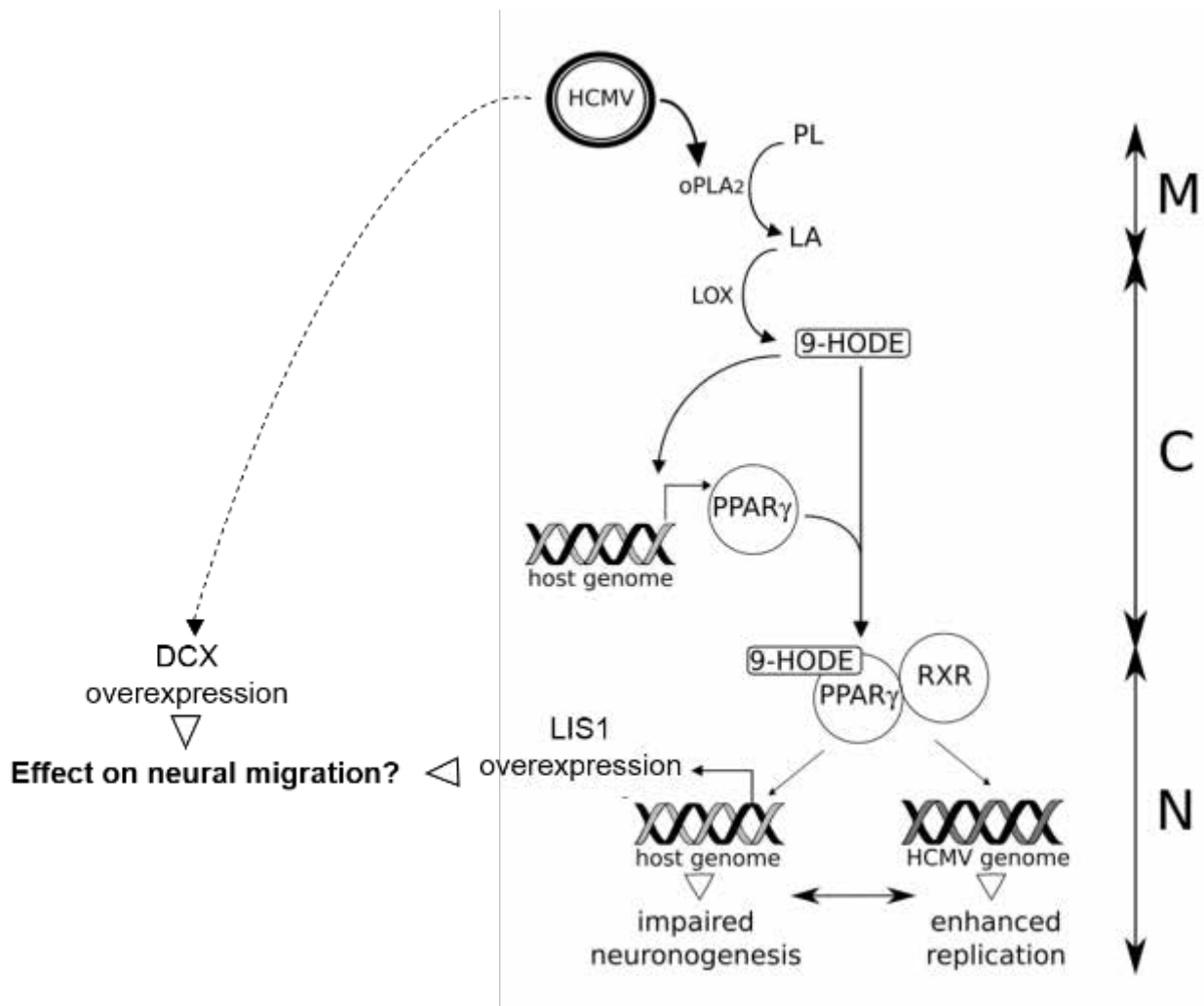


Fig. 7. Modèle proposé du rôle de PPAR γ , LIS1 et DCX lors de l'infection des NSC par le HCMV. D'après (Leghmar et al., 2015) et (Rolland et al., 2016).

L'infection congénitale par le HCMV est la première cause de séquelles neurologiques acquises. Il s'agit donc d'un enjeu de santé publique. Cependant, les mécanismes par lesquels le virus induit ces séquelles neurologiques restent aujourd'hui mal connus.

Nous avons identifié deux mécanismes par lesquels l'infection par le HCMV pourrait impacter le développement cérébral :

1. L'inhibition de la différenciation neurale

Mon travail de thèse a permis de montrer que l'infection des NSC inhibe leur différenciation en neurones.

Nous avons identifié un acteur clé de ce processus : le facteur de transcription PPAR γ . Nous avons également identifié le ligand de PPAR γ produit lors de l'infection : le 9-HODE.

2. Un hypothétique défaut de migration

Notre travail a également montré que l'infection des NSC par le HCMV induisait une surexpression des protéines de migration LIS1 et DCX. On peut supposer que ces surexpressions aient des conséquences sur la migration cellulaire. La surexpression de LIS1 semble dépendante de l'activité de PPAR γ . Or, des mutations dans les gènes codants pour LIS1 et DCX sont causatives d'une maladie monogénique, la lissencéphalie. La dérégulation de l'expression des protéines LIS1 et DCX pourrait être une base physiopathologique commune entre les séquelles de type « lissencephaly-like » chez les fœtus infectés et la lissencéphalie.

Pour conclure, ce travail ouvre la voie à l'identification de facteurs (notamment lipidiques) qui pourront servir de marqueurs pronostiques de la sévérité de l'infection. Ce travail suggère qu'il existe des bases physiopathologiques communes entre l'infection congénitale par le HCMV et une maladie monogénique, la lissencéphalie. Ainsi les connaissances acquises sur la lissencéphalie peuvent enrichir la recherche sur l'infection congénitale par le HCMV. Ces données ouvrent également la voie à l'étude des conséquences de l'infection par le HCMV sur la migration des cellules neurales.

BIBLIOGRAPHIE

Akamatsu, W., Fujihara, H., Mitsuhashi, T., Yano, M., Shibata, S., Hayakawa, Y., Okano, H.J., Sakakibara, S., Takano, H., Takano, T., *et al.* (2005). The RNA-binding protein HuD regulates neuronal cell identity and maturation. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* *102*, 4625-4630.

Albrecht, T., and Weller, T.H. (1980). Heterogeneous morphologic features of plaques induced by five strains of human cytomegalovirus. *American journal of clinical pathology* *73*, 648-654.

Bailey, S.T., and Ghosh, S. (2005). 'PPAR'ing ways with inflammation. *Nature immunology* *6*, 966-967.

Benoist, G., Salomon, L.J., Jacquemard, F., Daffos, F., and Ville, Y. (2008). The prognostic value of ultrasound abnormalities and biological parameters in blood of fetuses infected with cytomegalovirus. *Bjog* *115*, 823-829.

Bi, W., Sapir, T., Shchelochkov, O.A., Zhang, F., Withers, M.A., Hunter, J.V., Levy, T., Shinder, V., Peiffer, D.A., Gunderson, K.L., *et al.* (2009). Increased LIS1 expression affects human and mouse brain development. *Nature genetics* *41*, 168-177.

Birney, E., Stamatoyannopoulos, J.A., Dutta, A., Guigo, R., Gingeras, T.R., Margulies, E.H., Weng, Z., Snyder, M., Dermitzakis, E.T., Thurman, R.E., *et al.* (2007). Identification and analysis of functional elements in 1% of the human genome by the ENCODE pilot project. *Nature* *447*, 799-816.

Boissart, C., Nissan, X., Giraud-Triboulet, K., Peschanski, M., and Benchoua, A. (2012). miR-125 potentiates early neural specification of human embryonic stem cells. *Development (Cambridge, England)* *139*, 1247-1257.

Boissart, C., Poulet, A., Georges, P., Darville, H., Julita, E., Delorme, R., Bourgeron, T., Peschanski, M., and Benchoua, A. (2013). Differentiation from human pluripotent stem cells of cortical neurons of the superficial layers amenable to psychiatric disease modeling and high-throughput drug screening. *Translational psychiatry* *3*, e294.

Bonne, S., Sauleau, E., Sananes, N., Akaladios, C., Rongieres, C., and Pirrello, O. (2016). Influence of medically assisted reproduction techniques on crown-rump length and biochemical markers of trisomy 21 in the first trimester of pregnancy. *Fertility and sterility* *105*, 410-416.

Bosnjak, V.M., Dakovic, I., Duranovic, V., Lujic, L., Krakar, G., and Marn, B. (2011). Malformations of cortical development in children with congenital cytomegalovirus infection - A study of nine children with proven congenital cytomegalovirus infection. *Collegium antropologicum* *35 Suppl 1*, 229-234.

Braissant, O., and Wahli, W. (1998). Differential expression of peroxisome proliferator-activated receptor-alpha, -beta, and -gamma during rat embryonic development. *Endocrinology* *139*, 2748-2754.

Britt, W.J., and Boppana, S. (2004). Human cytomegalovirus virion proteins. *Human immunology* *65*, 395-402.

Calegari, F., and Huttner, W.B. (2003). An inhibition of cyclin-dependent kinases that lengthens, but does not arrest, neuroepithelial cell cycle induces premature neurogenesis. *Journal of cell science* *116*, 4947-4955.

Cannon, M.J. (2009). Congenital cytomegalovirus (CMV) epidemiology and awareness. *J Clin Virol* *46 Suppl 4*, S6-10.

Cannon, M.J., Griffiths, P.D., Aston, V., and Rawlinson, W.D. (2014). Universal newborn screening for congenital CMV infection: what is the evidence of potential benefit? *Reviews in medical virology* *24*, 291-307.

Capretti, M.G., Lanari, M., Tani, G., Ancora, G., Sciutti, R., Marsico, C., Lazzarotto, T., Gabrielli, L., Guerra, B., Corvaglia, L., *et al.* (2014). Role of cerebral ultrasound and magnetic resonance imaging in newborns with congenital cytomegalovirus infection. *Brain & development* *36*, 203-211.

Cardoso, C., Leventer, R.J., Dowling, J.J., Ward, H.L., Chung, J., Petras, K.S., Roseberry, J.A., Weiss, A.M., Das, S., Martin, C.L., *et al.* (2002). Clinical and molecular basis of classical lissencephaly: Mutations in the LIS1 gene (PAFAH1B1). *Human mutation* *19*, 4-15.

Caspi, M., Atlas, R., Kantor, A., Sapir, T., and Reiner, O. (2000). Interaction between LIS1 and doublecortin, two lissencephaly gene products. *Human molecular genetics* *9*, 2205-2213.

Chang, L., and Goldman, R.D. (2004). Intermediate filaments mediate cytoskeletal crosstalk. *Nature reviews* 5, 601-613.

Chawla, A., Repa, J.J., Evans, R.M., and Mangelsdorf, D.J. (2001). Nuclear receptors and lipid physiology: opening the X-files. *Science (New York, NY)* 294, 1866-1870.

Cheeran, M.C., Lokensgard, J.R., and Schleiss, M.R. (2009). Neuropathogenesis of congenital cytomegalovirus infection: disease mechanisms and prospects for intervention. *Clinical microbiology reviews* 22, 99-126, Table of Contents.

Chen, Y., Cui, Y., Shen, B., Niu, Y., Zhao, X., Wang, L., Wang, J., Li, W., Zhou, Q., Ji, W., *et al.* (2015). Germline acquisition of Cas9/RNA-mediated gene modifications in monkeys. *Cell research* 25, 262-265.

Choi, K.Y., Root, M., and McGregor, A. (2016). A Novel Non-Replication-Competent Cytomegalovirus Capsid Mutant Vaccine Strategy Is Effective in Reducing Congenital Infection. *Journal of virology* 90, 7902-7919.

Cimini, A., and Ceru, M.P. (2008). Emerging roles of peroxisome proliferator-activated receptors (PPARs) in the regulation of neural stem cells proliferation and differentiation. *Stem cell reviews* 4, 293-303.

Cinque, P., Marenzi, R., and Ceresa, D. (1997). Cytomegalovirus infections of the nervous system. *Intervirology* 40, 85-97.

Clark, G.D. (2015). Platelet-Activating Factor Acetylhydrolase and Brain Development. *The Enzymes* 38, 37-42.

Coleman, S., Choi, K.Y., Root, M., and McGregor, A. (2016). A Homolog Pentameric Complex Dictates Viral Epithelial Tropism, Pathogenicity and Congenital Infection Rate in Guinea Pig Cytomegalovirus. *PLoS pathogens* 12, e1005755.

Compton, T. (2004). Receptors and immune sensors: the complex entry path of human cytomegalovirus. *Trends in cell biology* 14, 5-8.

Compton, T., Nowlin, D.M., and Cooper, N.R. (1993). Initiation of human cytomegalovirus infection requires initial interaction with cell surface heparan sulfate. *Virology* 193, 834-841.

Conti, L., Pollard, S.M., Gorba, T., Reitano, E., Toselli, M., Biella, G., Sun, Y., Sanzone, S., Ying, Q.L., Cattaneo, E., *et al.* (2005). Niche-independent symmetrical self-renewal of a mammalian tissue stem cell. *PLoS biology* 3, e283.

Coonrod, D., Collier, A.C., Ashley, R., DeRouen, T., and Corey, L. (1998). Association between cytomegalovirus seroconversion and upper genital tract infection among women attending a sexually transmitted disease clinic: a prospective study. *The Journal of infectious diseases* 177, 1188-1193.

Couillard-Despres, S., Winner, B., Schaubeck, S., Aigner, R., Vroemen, M., Weidner, N., Bogdahn, U., Winkler, J., Kuhn, H.G., and Aigner, L. (2005). Doublecortin expression levels in adult brain reflect neurogenesis. *The European journal of neuroscience* 21, 1-14.

Crough, T., and Khanna, R. (2009). Immunobiology of human cytomegalovirus: from bench to bedside. *Clinical microbiology reviews* 22, 76-98, Table of Contents.

D'Aiuto, L., Di Maio, R., Heath, B., Raimondi, G., Milosevic, J., Watson, A.M., Bamne, M., Parks, W.T., Yang, L., Lin, B., *et al.* (2012). Human induced pluripotent stem cell-derived models to investigate human cytomegalovirus infection in neural cells. *PloS one* 7, e49700.

de Bouard, S., Christov, C., Guillamo, J.S., Kassar-Duchossoy, L., Palfi, S., Leguerinel, C., Masset, M., Cohen-Hagenauer, O., Peschanski, M., and Lefrancois, T. (2002). Invasion of human glioma biopsy specimens in cultures of rodent brain slices: a quantitative analysis. *Journal of neurosurgery* 97, 169-176.

de Vries, J.J., Vossen, A.C., Kroes, A.C., and van der Zeijst, B.A. (2011). Implementing neonatal screening for congenital cytomegalovirus: addressing the deafness of policy makers. *Reviews in medical virology* 21, 54-61.

Dekker, J., Rippe, K., Dekker, M., and Kleckner, N. (2002). Capturing chromosome conformation. *Science (New York, NY)* 295, 1306-1311.

des Portes, V., Pinard, J.M., Billuart, P., Vinet, M.C., Koulakoff, A., Carrie, A., Gelot, A., Dupuis, E., Motte, J., Berwald-Netter, Y., *et al.* (1998). A novel CNS gene required for neuronal migration and involved in X-linked subcortical laminar heterotopia and lissencephaly syndrome. *Cell* **92**, 51-61.

Desveaux, C., Klein, J., Leruez-Ville, M., Ramirez-Torres, A., Lacroix, C., Breuil, B., Froment, C., Bascands, J.L., Schanstra, J.P., and Ville, Y. (2016). Identification of Symptomatic Fetuses Infected with Cytomegalovirus Using Amniotic Fluid Peptide Biomarkers. *PLoS pathogens* **12**, e1005395.

Digel, M., Laib Sampaio, K., Jahn, G., Sinzger, C. (2006). Evidence for direct transfer of cytoplasmic material from infected to uninfected cells during cell-associated spread of human cytomegalovirus. *Journal of Clinical Virology*.

Dobyns, W.B., Reiner, O., Carrozzo, R., and Ledbetter, D.H. (1993). Lissencephaly. A human brain malformation associated with deletion of the LIS1 gene located at chromosome 17p13. *Jama* **270**, 2838-2842.

Dohner, K., and Sodeik, B. (2005). The role of the cytoskeleton during viral infection. *Current topics in microbiology and immunology* **285**, 67-108.

Dormandy, J.A., Charbonnel, B., Eckland, D.J., Erdmann, E., Massi-Benedetti, M., Moules, I.K., Skene, A.M., Tan, M.H., Lefebvre, P.J., Murray, G.D., *et al.* (2005). Secondary prevention of macrovascular events in patients with type 2 diabetes in the PROactive Study (PROspective pioglitAzone Clinical Trial In macroVascular Events): a randomised controlled trial. *Lancet (London, England)* **366**, 1279-1289.

Dugas-Ford, J., and Ragsdale, C.W. (2015). Levels of homology and the problem of neocortex. *Annual review of neuroscience* **38**, 351-368.

Dunn, W., Chou, C., Li, H., Hai, R., Patterson, D., Stolc, V., Zhu, H., and Liu, F. (2003). Functional profiling of a human cytomegalovirus genome. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **100**, 14223-14228.

Dworsky, M., Yow, M., Stagno, S., Pass, R.F., and Alford, C. (1983). Cytomegalovirus infection of breast milk and transmission in infancy. *Pediatrics* **72**, 295-299.

E.(2007). *Human Herpesviruses Biology, Therapy, and Immunoprophylaxis, Vol 1* (Cambridge: Cambridge University Press).

Fabbri, E., Revello, M.G., Furione, M., Zavattoni, M., Lilleri, D., Tassis, B., Quarenghi, A., Rustico, M., Nicolini, U., Ferrazzi, E., *et al.* (2011). Prognostic markers of symptomatic congenital human cytomegalovirus infection in fetal blood. *Bjog* **118**, 448-456.

Faulkner, N.E., Dujardin, D.L., Tai, C.Y., Vaughan, K.T., O'Connell, C.B., Wang, Y., and Vallee, R.B. (2000). A role for the lissencephaly gene LIS1 in mitosis and cytoplasmic dynein function. *Nature cell biology* **2**, 784-791.

Fisher, S., Genbacev, O., Maidji, E., and Pereira, L. (2000). Human cytomegalovirus infection of placental cytotrophoblasts in vitro and in utero: implications for transmission and pathogenesis. *Journal of virology* **74**, 6808-6820.

Foca, E., Motta, D., Pollara, C., Brianese, N., Gotti, D., Albini, L., Quiros-Roldan, E., Torti, C., and Manca, N. (2012). Impact of detectable human cytomegalovirus DNAemia on viro-immunological effectiveness of HAART in HIV-infected patients naive to antiretroviral therapy. *The new microbiologica* **35**, 227-231.

Forsberg-Nilsson, K., Behar, T.N., Afrakhte, M., Barker, J.L., and McKay, R.D. (1998). Platelet-derived growth factor induces chemotaxis of neuroepithelial stem cells. *Journal of neuroscience research* **53**, 521-530.

Fortunato, E.A., McElroy, A.K., Sanchez, I., and Spector, D.H. (2000). Exploitation of cellular signaling and regulatory pathways by human cytomegalovirus. *Trends in microbiology* **8**, 111-119.

Frazer, K.A., Pachter, L., Poliakov, A., Rubin, E.M., and Dubchak, I. (2004). VISTA: computational tools for comparative genomics. *Nucleic acids research* **32**, W273-279.

Freed, D.C., Tang, Q., Tang, A., Li, F., He, X., Huang, Z., Meng, W., Xia, L., Finnefrock, A.C., Durr, E., *et al.* (2013). Pentameric complex of viral glycoprotein H is the primary target for potent neutralization by a human cytomegalovirus vaccine. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **110**, E4997-5005.

Fry, A.E., Cushion, T.D., and Pilz, D.T. (2014). The genetics of lissencephaly. *Am J Med Genet C Semin Med Genet* 166C, 198-210.

Gabrielli, L., Bonasoni, M.P., Santini, D., Piccirilli, G., Chiereghin, A., Petrisli, E., Dolcetti, R., Guerra, B., Piccioli, M., Lanari, M., *et al.* (2012). Congenital cytomegalovirus infection: patterns of fetal brain damage. *Clin Microbiol Infect* 18, E419-427.

Gallant, J.E., Moore, R.D., Richman, D.D., Keruly, J., and Chaisson, R.E. (1992). Incidence and natural history of cytomegalovirus disease in patients with advanced human immunodeficiency virus disease treated with zidovudine. The Zidovudine Epidemiology Study Group. *The Journal of infectious diseases* 166, 1223-1227.

Gandhi, M.K., and Khanna, R. (2004). Human cytomegalovirus: clinical aspects, immune regulation, and emerging treatments. *The Lancet* 4, 725-738.

Gaspard, N., Bouschet, T., Hourez, R., Dimidschstein, J., Naeije, G., van den Ameele, J., Espuny-Camacho, I., Herpoel, A., Passante, L., Schiffmann, S.N., *et al.* (2008). An intrinsic mechanism of corticogenesis from embryonic stem cells. *Nature* 455, 351-357.

Giugni, T.D., Soderberg, C., Ham, D.J., Bautista, R.M., Hedlund, K.O., Moller, E., and Zaia, J.A. (1996). Neutralization of human cytomegalovirus by human CD13-specific antibodies. *The Journal of infectious diseases* 173, 1062-1071.

Gleeson, J.G., Allen, K.M., Fox, J.W., Lamperti, E.D., Berkovic, S., Scheffer, I., Cooper, E.C., Dobyns, W.B., Minnerath, S.R., Ross, M.E., *et al.* (1998). Doublecortin, a brain-specific gene mutated in human X-linked lissencephaly and double cortex syndrome, encodes a putative signaling protein. *Cell* 92, 63-72.

Gleeson, J.G., Lin, P.T., Flanagan, L.A., and Walsh, C.A. (1999). Doublecortin is a microtubule-associated protein and is expressed widely by migrating neurons. *Neuron* 23, 257-271.

Goldmacher, V.S., Bartle, L.M., Skaletskaya, A., Dionne, C.A., Kedersha, N.L., Vater, C.A., Han, J.W., Lutz, R.J., Watanabe, S., Cahir McFarland, E.D., *et al.* (1999). A cytomegalovirus-encoded mitochondria-localized inhibitor of apoptosis structurally unrelated to Bcl-2. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 96, 12536-12541.

Gotz, M., and Huttner, W.B. (2005). The cell biology of neurogenesis. *Nature reviews* 6, 777-788.

Gowan, K., Helms, A.W., Hunsaker, T.L., Collisson, T., Ebert, P.J., Odom, R., and Johnson, J.E. (2001). Crossinhibitory activities of Ngn1 and Math1 allow specification of distinct dorsal interneurons. *Neuron* 31, 219-232.

Gunkel, J., Wolfs, T.F., de Vries, L.S., and Nijman, J. Predictors of severity for postnatal cytomegalovirus infection in preterm infants and implications for treatment. *Expert review of anti-infective therapy* 12, 1345-1355.

Gupta, A., Tsai, L.H., and Wynshaw-Boris, A. (2002). Life is a journey: a genetic look at neocortical development. *Nat Rev Genet* 3, 342-355.

Halary, F., Amara, A., Lortat-Jacob, H., Messerle, M., Delaunay, T., Houles, C., Fieschi, F., Arenzana-Seisdedos, F., Moreau, J.F., and Dechanet-Merville, J. (2002). Human cytomegalovirus binding to DC-SIGN is required for dendritic cell infection and target cell trans-infection. *Immunity* 17, 653-664.

Halwachs-Baumann, G. (2011). *Congenital Cytomegalovirus Infection*, Gabriele Halwachs-Baumann edn (Steyr: Springer Vienna).

Hamprecht, K., Maschmann, J., Vochem, M., Dietz, K., Speer, C.P., and Jahn, G. (2001). Epidemiology of transmission of cytomegalovirus from mother to preterm infant by breastfeeding. *Lancet (London, England)* 357, 513-518.

Haspot, F., Lavault, A., Sinzger, C., Laib Sampaio, K., Stierhof, Y.D., Pilet, P., Bressolette-Bodin, C., and Halary, F. (2012). Human cytomegalovirus entry into dendritic cells occurs via a macropinocytosis-like pathway in a pH-independent and cholesterol-dependent manner. *PloS one* 7, e34795.

Haverfield, E.V., Whited, A.J., Petras, K.S., Dobyns, W.B., and Das, S. (2009). Intragenic deletions and duplications of the LIS1 and DCX genes: a major disease-causing mechanism in lissencephaly and subcortical band heterotopia. *Eur J Hum Genet* 17, 911-918.

Hayward, J.C., Titelbaum, D.S., Clancy, R.R., and Zimmerman, R.A. (1991). Lissencephaly-pachygyria associated with congenital cytomegalovirus infection. *Journal of child neurology* 6, 109-114.

Heikkinen, S., Auwerx, J., and Argmann, C.A. (2007). PPAR γ in human and mouse physiology. *Biochimica et biophysica acta* 1771, 999-1013.

Hockfield, S., and McKay, R.D. (1985). Identification of major cell classes in the developing mammalian nervous system. *J Neurosci* 5, 3310-3328.

Horesh, D., Sapir, T., Francis, F., Wolf, S.G., Caspi, M., Elbaum, M., Chelly, J., and Reiner, O. (1999). Doublecortin, a stabilizer of microtubules. *Human molecular genetics* 8, 1599-1610.

Howley, B.N.F.D.M.K.P.M. (2007). *Fields virology*, Vol 1, Wolters Kluwer Health/Lippincott Williams & Wilkins edn (Philadelphia: Wolters Kluwer Health/Lippincott Williams & Wilkins).

Hrvoj-Mihic, B., Bienvenu, T., Stefanacci, L., Muotri, A.R., and Semendeferi, K. (2013). Evolution, development, and plasticity of the human brain: from molecules to bones. *Frontiers in human neuroscience* 7, 707.

Ihle, J.N. (1996). STATs: signal transducers and activators of transcription. *Cell* 84, 331-334.

Jin, Z., Liu, L., Bian, W., Chen, Y., Xu, G., Cheng, L., and Jing, N. (2009). Different transcription factors regulate nestin gene expression during P19 cell neural differentiation and central nervous system development. *The Journal of biological chemistry* 284, 8160-8173.

Kalejta, R.F. (2008). Tegument proteins of human cytomegalovirus. *Microbiol Mol Biol Rev* 72, 249-265, table of contents.

Kamiya, A., Kubo, K., Tomoda, T., Takaki, M., Youn, R., Ozeki, Y., Sawamura, N., Park, U., Kudo, C., Okawa, M., *et al.* (2005). A schizophrenia-associated mutation of DISC1 perturbs cerebral cortex development. *Nature cell biology* 7, 1167-1178.

Kapadia, R., Yi, J.H., and Vemuganti, R. (2008). Mechanisms of anti-inflammatory and neuroprotective actions of PPAR- γ agonists. *Front Biosci* 13, 1813-1826.

Karnavas, T., Mandalos, N., Malas, S., and Remboutsika, E. (2013). SoxB, cell cycle and neurogenesis. *Frontiers in physiology* 4, 298.

Kato, M. (2015). Genotype-phenotype correlation in neuronal migration disorders and cortical dysplasias. *Frontiers in neuroscience* 9, 181.

Kato, M., and Dobyns, W.B. (2003). Lissencephaly and the molecular basis of neuronal migration. *Human molecular genetics* 12 *Spec No 1*, R89-96.

Kholmanskikh, S.S., Dobrin, J.S., Wynshaw-Boris, A., Letourneau, P.C., and Ross, M.E. (2003). Disregulated RhoGTPases and actin cytoskeleton contribute to the migration defect in Lis1-deficient neurons. *J Neurosci* 23, 8673-8681.

Kholmanskikh, S.S., Koeller, H.B., Wynshaw-Boris, A., Gomez, T., Letourneau, P.C., and Ross, M.E. (2006). Calcium-dependent interaction of Lis1 with IQGAP1 and Cdc42 promotes neuronal motility. *Nature neuroscience* 9, 50-57.

Kimberlin, D.W., Lin, C.Y., Sanchez, P.J., Demmler, G.J., Dankner, W., Shelton, M., Jacobs, R.F., Vaudry, W., Pass, R.F., Kiell, J.M., *et al.* (2003). Effect of ganciclovir therapy on hearing in symptomatic congenital cytomegalovirus disease involving the central nervous system: a randomized, controlled trial. *The Journal of pediatrics* 143, 16-25.

Klemola, E., Von Essen, R., Henle, G., and Henle, W. (1970). Infectious-mononucleosis-like disease with negative heterophil agglutination test. Clinical features in relation to Epstein-Barr virus and cytomegalovirus antibodies. *The Journal of infectious diseases* 121, 608-614.

Kondratova, A.A., Neznanov, N., Kondratov, R.V., and Gudkov, A.V. (2005). Poliovirus protein 3A binds and inactivates LIS1, causing block of membrane protein trafficking and deregulation of cell division. *Cell cycle (Georgetown, Tex)* 4, 1403-1410.

Kornblihtt, A.R. (2005). Promoter usage and alternative splicing. *Current opinion in cell biology* 17, 262-268.

Kostovic, I., Sedmak, G., Vuksic, M., and Judas, M. (2015). The relevance of human fetal subplate zone for developmental neuropathology of neuronal migration disorders and cortical dysplasia. *CNS neuroscience & therapeutics* 21, 74-82.

Kosugi, I., Shinmura, Y., Kawasaki, H., Arai, Y., Li, R.Y., Baba, S., and Tsutsui, Y. (2000). Cytomegalovirus infection of the central nervous system stem cells from mouse embryo: a model for

developmental brain disorders induced by cytomegalovirus. *Laboratory investigation; a journal of technical methods and pathology* *80*, 1373-1383.

Kriegstein, A., and Alvarez-Buylla, A. (2009). The glial nature of embryonic and adult neural stem cells. *Annual review of neuroscience* *32*, 149-184.

Lambert de Rouvroit, C., and Goffinet, A.M. (2001). Neuronal migration. *Mechanisms of development* *105*, 47-56.

Lancini, D., Faddy, H.M., Flower, R., and Hogan, C. (2014). Cytomegalovirus disease in immunocompetent adults. *The Medical journal of Australia* *201*, 578-580.

Leghmar, K., Cenac, N., Rolland, M., Martin, H., Rauwel, B., Bertrand-Michel, J., Le Faouder, P., Benard, M., Casper, C., Davrinche, C., *et al.* (2015). Cytomegalovirus Infection Triggers the Secretion of the PPARgamma Agonists 15-Hydroxyeicosatetraenoic Acid (15-HETE) and 13-Hydroxyoctadecadienoic Acid (13-HODE) in Human Cytotrophoblasts and Placental Cultures. *PLoS one* *10*, e0132627.

Lehrke, M., and Lazar, M.A. (2005). The many faces of PPARgamma. *Cell* *123*, 993-999.

Lendahl, U., Zimmerman, L.B., and McKay, R.D. (1990). CNS stem cells express a new class of intermediate filament protein. *Cell* *60*, 585-595.

Leruez-Ville, M., Ghout, I., Bussieres, L., Stirnemann, J., Magny, J.F., Couderc, S., Salomon, L.J., Guilleminot, T., Aegerter, P., Benoist, G., *et al.* (2016). In utero treatment of congenital cytomegalovirus infection with valacyclovir in a multicenter, open-label, phase II study. *American journal of obstetrics and gynecology*.

Letinic, K., Zoncu, R., and Rakic, P. (2002). Origin of GABAergic neurons in the human neocortex. *Nature* *417*, 645-649.

Liao, H., Sato, H., Chiba, R., Kawai, T., Nakabayashi, K., Hata, K., Akutsu, H., Fujiwara, S., and Nakamura, H. (2016). Human cytomegalovirus downregulates SLITRK6 expression through IE2. *Journal of neurovirology*.

Lilleri, D., Kabanova, A., Lanzavecchia, A., and Gerna, G. (2012). Antibodies against neutralization epitopes of human cytomegalovirus gH/gL/pUL128-130-131 complex and virus spreading may correlate with virus control in vivo. *Journal of clinical immunology* *32*, 1324-1331.

Lilleri, D., Kabanova, A., Revello, M.G., Percivalle, E., Sarasini, A., Genini, E., Sallusto, F., Lanzavecchia, A., Corti, D., and Gerna, G. (2013). Fetal human cytomegalovirus transmission correlates with delayed maternal antibodies to gH/gL/pUL128-130-131 complex during primary infection. *PLoS one* *8*, e59863.

Liu, J., Wei, Y., Chen, Y., Xu, X., and Zhang, H. (2011). Differentiation of neural stem cells influences their chemotactic responses to vascular endothelial growth factor. *Journal of neuroscience research* *89*, 1173-1184.

Liu, J.S. (2011). Molecular genetics of neuronal migration disorders. *Current neurology and neuroscience reports* *11*, 171-178.

Liu, Z., Steward, R., and Luo, L. (2000). *Drosophila* Lis1 is required for neuroblast proliferation, dendritic elaboration and axonal transport. *Nature cell biology* *2*, 776-783.

Lo Nigro, C., Chong, C.S., Smith, A.C., Dobyns, W.B., Carrozzo, R., and Ledbetter, D.H. (1997). Point mutations and an intragenic deletion in LIS1, the lissencephaly causative gene in isolated lissencephaly sequence and Miller-Dieker syndrome. *Human molecular genetics* *6*, 157-164.

Luo, M.H., Hannemann, H., Kulkarni, A.S., Schwartz, P.H., O'Dowd, J.M., and Fortunato, E.A. (2010). Human cytomegalovirus infection causes premature and abnormal differentiation of human neural progenitor cells. *Journal of virology* *84*, 3528-3541.

Luo, M.H., Schwartz, P.H., and Fortunato, E.A. (2008). Neonatal neural progenitor cells and their neuronal and glial cell derivatives are fully permissive for human cytomegalovirus infection. *Journal of virology* *82*, 9994-10007.

Ma, Q., Fode, C., Guillemot, F., and Anderson, D.J. (1999). Neurogenin1 and neurogenin2 control two distinct waves of neurogenesis in developing dorsal root ganglia. *Genes & development* *13*, 1717-1728.

Ma, Y., Wang, N., Li, M., Gao, S., Wang, L., Zheng, B., Qi, Y., and Ruan, Q. (2012). Human CMV transcripts: an overview. *Future microbiology* 7, 577-593.

Maidji, E., Nigro, G., Tabata, T., McDonagh, S., Nozawa, N., Shiboski, S., Muci, S., Anceschi, M.M., Aziz, N., Adler, S.P., *et al.* (2010). Antibody treatment promotes compensation for human cytomegalovirus-induced pathogenesis and a hypoxia-like condition in placentas with congenital infection. *The American journal of pathology* 177, 1298-1310.

Matsuda, T., Nakamura, T., Nakao, K., Arai, T., Katsuki, M., Heike, T., and Yokota, T. (1999). STAT3 activation is sufficient to maintain an undifferentiated state of mouse embryonic stem cells. *The EMBO journal* 18, 4261-4269.

McKeating, J.A., Grundy, J.E., Varghese, Z., and Griffiths, P.D. (1986). Detection of cytomegalovirus by ELISA in urine samples is inhibited by beta 2 microglobulin. *Journal of medical virology* 18, 341-348.

McKenney, R.J., Vershinin, M., Kunwar, A., Vallee, R.B., and Gross, S.P. (2010). LIS1 and NudE Induce a Persistent Dynein Force-Producing State. *Cell* 141, 304-314.

Meyer, G., Perez-Garcia, C.G., and Gleeson, J.G. (2002). Selective expression of doublecortin and LIS1 in developing human cortex suggests unique modes of neuronal movement. *Cereb Cortex* 12, 1225-1236.

Mocarski, E.S., Jr. (2002a). Immunomodulation by cytomegaloviruses: manipulative strategies beyond evasion. *Trends in microbiology* 10, 332-339.

Mocarski, E.S., Jr. (2002b). Virus self-improvement through inflammation: no pain, no gain. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 99, 3362-3364.

Moon, H.M., and Wynshaw-Boris, A. (2013). Cytoskeleton in action: lissencephaly, a neuronal migration disorder. *Wiley interdisciplinary reviews* 2, 229-245.

Morales-Garcia, J.A., Luna-Medina, R., Alfaro-Cervello, C., Cortes-Canteli, M., Santos, A., Garcia-Verdugo, J.M., and Perez-Castillo, A. (2011). Peroxisome proliferator-activated receptor gamma ligands regulate neural stem cell proliferation and differentiation in vitro and in vivo. *Glia* 59, 293-307.

Moreno, S., Farioli-Vecchioli, S., and Ceru, M.P. (2004). Immunolocalization of peroxisome proliferator-activated receptors and retinoid X receptors in the adult rat CNS. *Neuroscience* 123, 131-145.

Murph, J.R., Bale, J.F., Jr., Murray, J.C., Stinski, M.F., and Perlman, S. (1986). Cytomegalovirus transmission in a Midwest day care center: possible relationship to child care practices. *The Journal of pediatrics* 109, 35-39.

Murphy, J.C., Fischle, W., Verdin, E., and Sinclair, J.H. (2002). Control of cytomegalovirus lytic gene expression by histone acetylation. *The EMBO journal* 21, 1112-1120.

Mutnal, M.B., Cheeran, M.C., Hu, S., and Lokensgard, J.R. (2011). Murine cytomegalovirus infection of neural stem cells alters neurogenesis in the developing brain. *PloS one* 6, e16211.

Nagy, L., Tontonoz, P., Alvarez, J.G., Chen, H., and Evans, R.M. (1998). Oxidized LDL regulates macrophage gene expression through ligand activation of PPARgamma. *Cell* 93, 229-240.

Nakajima, A., Wada, K., Miki, H., Kubota, N., Nakajima, N., Terauchi, Y., Ohnishi, S., Saubermann, L.J., Kadowaki, T., Blumberg, R.S., *et al.* (2001). Endogenous PPAR gamma mediates anti-inflammatory activity in murine ischemia-reperfusion injury. *Gastroenterology* 120, 460-469.

Nigro, G., Adler, S.P., La Torre, R., and Best, A.M. (2005). Passive immunization during pregnancy for congenital cytomegalovirus infection. *The New England journal of medicine* 353, 1350-1362.

Niu, Y., Shen, B., Cui, Y., Chen, Y., Wang, J., Wang, L., Kang, Y., Zhao, X., Si, W., Li, W., *et al.* (2014). Generation of gene-modified cynomolgus monkey via Cas9/RNA-mediated gene targeting in one-cell embryos. *Cell* 156, 836-843.

Nulty, J., Alsaffar, M., and Barry, D. (2015). Radial glial cells organize the central nervous system via microtubule dependant processes. *Brain research*.

Odeberg, J., Wolmer, N., Falci, S., Westgren, M., Seiger, A., and Soderberg-Naucler, C. (2006). Human cytomegalovirus inhibits neuronal differentiation and induces apoptosis in human neural precursor cells. *Journal of virology* 80, 8929-8939.

Odeberg, J., Wolmer, N., Falci, S., Westgren, M., Sundtrom, E., Seiger, A., and Soderberg-Naucler, C. (2007). Late human cytomegalovirus (HCMV) proteins inhibit differentiation of human neural precursor cells into astrocytes. *Journal of neuroscience research* 85, 583-593.

Oikari, L.E., Okolicsanyi, R.K., Qin, A., Yu, C., Griffiths, L.R., and Haupt, L.M. (2015). Cell surface heparan sulfate proteoglycans as novel markers of human neural stem cell fate determination. *Stem cell research* 16, 92-104.

Okano, H., Kawahara, H., Toriya, M., Nakao, K., Shibata, S., and Imai, T. (2005). Function of RNA-binding protein Musashi-1 in stem cells. *Experimental cell research* 306, 349-356.

Oliver, S.E., Cloud, G.A., Sanchez, P.J., Demmler, G.J., Dankner, W., Shelton, M., Jacobs, R.F., Vaudry, W., Pass, R.F., Soong, S.J., *et al.* (2009). Neurodevelopmental outcomes following ganciclovir therapy in symptomatic congenital cytomegalovirus infections involving the central nervous system. *J Clin Virol* 46 Suppl 4, S22-26.

Palmer, C.N., Hsu, M.H., Griffin, H.J., and Johnson, E.F. (1995). Novel sequence determinants in peroxisome proliferator signaling. *The Journal of biological chemistry* 270, 16114-16121.

Pass, R.F. (1985). Epidemiology and transmission of cytomegalovirus. *The Journal of infectious diseases* 152, 243-248.

Pereira, L., and Maidji, E. (2008). Cytomegalovirus infection in the human placenta: maternal immunity and developmentally regulated receptors on trophoblasts converge. *Current topics in microbiology and immunology* 325, 383-395.

Pereira, L., Petitt, M., Fong, A., Tsuge, M., Tabata, T., Fang-Hoover, J., Maidji, E., Zydek, M., Zhou, Y., Inoue, N., *et al.* (2014). Intrauterine growth restriction caused by underlying congenital cytomegalovirus infection. *The Journal of infectious diseases* 209, 1573-1584.

Petrucelli, A., Umashankar, M., Zagallo, P., Rak, M., and Goodrum, F. (2012). Interactions between proteins encoded within the human cytomegalovirus UL133-UL138 locus. *Journal of virology* 86, 8653-8662.

Pollard, S.M., Conti, L., Sun, Y., Goffredo, D., and Smith, A. (2006). Adherent neural stem (NS) cells from fetal and adult forebrain. *Cereb Cortex* 16 Suppl 1, i112-120.

Prendergast, A.J., Klenerman, P., and Goulder, P.J. (2012). The impact of differential antiviral immunity in children and adults. *Nat Rev Immunol* 12, 636-648.

Rauwel, B., Mariame, B., Martin, H., Nielsen, R., Allart, S., Pipy, B., Mandrup, S., Devignes, M.D., Evain-Brion, D., Fournier, T., *et al.* (2010). Activation of peroxisome proliferator-activated receptor gamma by human cytomegalovirus for de novo replication impairs migration and invasiveness of cytotrophoblasts from early placentas. *Journal of virology* 84, 2946-2954.

Read, D.E., and Gorman, A.M. (2009). Involvement of Akt in neurite outgrowth. *Cell Mol Life Sci* 66, 2975-2984.

Reddehase, M.J. (2006). *Cytomegaloviruses: Molecular Biology and Immunology* Matthias J. Reddehase edn (Norwich: Caister Academic Press).

Reiner, O., Carrozzo, R., Shen, Y., Wehnert, M., Faustarella, F., Dobyns, W.B., Caskey, C.T., and Ledbetter, D.H. (1993). Isolation of a Miller-Dieker lissencephaly gene containing G protein beta-subunit-like repeats. *Nature* 364, 717-721.

Reynolds, D.W., Stagno, S., Hosty, T.S., Tiller, M., and Alford, C.A., Jr. (1973). Maternal cytomegalovirus excretion and perinatal infection. *The New England journal of medicine* 289, 1-5.

Rolland, M., Li, X., Sellier, Y., Martin, H., Perez-Berezo, T., Rauwel, B., Benchoua, A., Bessieres, B., Aziza, J., Cenac, N., *et al.* (2016). PPARgamma Is Activated during Congenital Cytomegalovirus Infection and Inhibits Neuronogenesis from Human Neural Stem Cells. *PLoS pathogens* 12, e1005547.

Romanelli, R.M., Magny, J.F., and Jacquemard, F. (2008). Prognostic markers of symptomatic congenital cytomegalovirus infection. *Braz J Infect Dis* 12, 38-43.

Ryckman, B.J., Rainish, B.L., Chase, M.C., Borton, J.A., Nelson, J.A., Jarvis, M.A., and Johnson, D.C. (2008). Characterization of the human cytomegalovirus gH/gL/UL128-131 complex that mediates entry into epithelial and endothelial cells. *Journal of virology* 82, 60-70.

Sagedal, S., Nordal, K.P., Hartmann, A., Sund, S., Scott, H., Degre, M., Foss, A., Leivestad, T., Osnes, K., Fauchald, P., *et al.* (2002). The impact of cytomegalovirus infection and disease on rejection episodes in renal allograft recipients. *Am J Transplant* 2, 850-856.

Saillour, Y., Carion, N., Quelin, C., Leger, P.L., Boddaert, N., Elie, C., Toutain, A., Mercier, S., Barthez, M.A., Milh, M., *et al.* (2009). LIS1-related isolated lissencephaly: spectrum of mutations and relationships with malformation severity. *Archives of neurology* 66, 1007-1015.

Sandberg, M., Kallstrom, M., and Muhr, J. (2005). Sox21 promotes the progression of vertebrate neurogenesis. *Nature neuroscience* 8, 995-1001.

Sapir, T., Elbaum, M., and Reiner, O. (1997). Reduction of microtubule catastrophe events by LIS1, platelet-activating factor acetylhydrolase subunit. *The EMBO journal* 16, 6977-6984.

Sapir, T., Horesh, D., Caspi, M., Atlas, R., Burgess, H.A., Wolf, S.G., Francis, F., Chelly, J., Elbaum, M., Pietrokovski, S., *et al.* (2000). Doublecortin mutations cluster in evolutionarily conserved functional domains. *Human molecular genetics* 9, 703-712.

Sasaki, S., Shionoya, A., Ishida, M., Gambello, M.J., Yingling, J., Wynshaw-Boris, A., and Hirotsune, S. (2000). A LIS1/NUDEL/cytoplasmic dynein heavy chain complex in the developing and adult nervous system. *Neuron* 28, 681-696.

Schaiff, W.T., Barak, Y., and Sadovsky, Y. (2006). The pleiotropic function of PPAR gamma in the placenta. *Molecular and cellular endocrinology* 249, 10-15.

Scher, J.U., and Pillinger, M.H. (2005). 15d-PGJ2: the anti-inflammatory prostaglandin? *Clinical immunology (Orlando, Fla)* 114, 100-109.

Schleiss, M.R. (2008). Cytomegalovirus vaccine development. *Current topics in microbiology and immunology* 325, 361-382.

Schleiss, M.R. (2009). Cytomegalovirus vaccines: at last, a major step forward. *Herpes* 15, 44-45.

Schumacher, J., Anthoni, H., Dahdouh, F., Konig, I.R., Hillmer, A.M., Kluck, N., Manthey, M., Plume, E., Warnke, A., Remschmidt, H., *et al.* (2006). Strong genetic evidence of DCDC2 as a susceptibility gene for dyslexia. *American journal of human genetics* 78, 52-62.

Schust, J., Sperl, B., Hollis, A., Mayer, T.U., and Berg, T. (2006). Stattic: a small-molecule inhibitor of STAT3 activation and dimerization. *Chemistry & biology* 13, 1235-1242.

Shmueli, O., Gdalyahu, A., Sorokina, K., Nevo, E., Avivi, A., and Reiner, O. (2001). DCX in PC12 cells: CREB-mediated transcription and neurite outgrowth. *Human molecular genetics* 10, 1061-1070.

Sijmons, S., Van Ranst, M., and Maes, P. (2014). Genomic and functional characteristics of human cytomegalovirus revealed by next-generation sequencing. *Viruses* 6, 1049-1072.

Simpson, J.A., Chow, J.C., Baker, J., Avdalovic, N., Yuan, S., Au, D., Co, M.S., Vasquez, M., Britt, W.J., and Coelingh, K.L. (1993). Neutralizing monoclonal antibodies that distinguish three antigenic sites on human cytomegalovirus glycoprotein H have conformationally distinct binding sites. *Journal of virology* 67, 489-496.

Sinclair, J., and Sissons, P. (2006). Latency and reactivation of human cytomegalovirus. *The Journal of general virology* 87, 1763-1779.

Small, T.N. (1996). Immunologic reconstitution following stem cell transplantation. *Current opinion in hematology* 3, 461-465.

Smith, D.S., Niethammer, M., Ayala, R., Zhou, Y., Gambello, M.J., Wynshaw-Boris, A., and Tsai, L.H. (2000). Regulation of cytoplasmic dynein behaviour and microtubule organization by mammalian Lis1. *Nature cell biology* 2, 767-775.

Soderberg, C., Giugni, T.D., Zaia, J.A., Larsson, S., Wahlberg, J.M., and Moller, E. (1993). CD13 (human aminopeptidase N) mediates human cytomegalovirus infection. *Journal of virology* 67, 6576-6585.

Stowell, J.D., Mask, K., Amin, M., Clark, R., Levis, D., Hendley, W., Lanzieri, T.M., Dollard, S.C., and Cannon, M.J. (2014). Cross-sectional study of cytomegalovirus shedding and immunological markers among seropositive children and their mothers. *BMC infectious diseases* 14, 568.

Stratton, R.F., Dobyns, W.B., Airhart, S.D., and Ledbetter, D.H. (1984). New chromosomal syndrome: Miller-Dieker syndrome and monosomy 17p13. *Human genetics* 67, 193-200.

Sun, Y., Nadal-Vicens, M., Misono, S., Lin, M.Z., Zubiaga, A., Hua, X., Fan, G., and Greenberg, M.E. (2001). Neurogenin promotes neurogenesis and inhibits glial differentiation by independent mechanisms. *Cell* *104*, 365-376.

Sundararajan, S., Jiang, Q., Heneka, M., and Landreth, G. (2006). PPARgamma as a therapeutic target in central nervous system diseases. *Neurochemistry international* *49*, 136-144.

Sweeten, T.L., Posey, D.J., and McDougle, C.J. (2004). Brief report: autistic disorder in three children with cytomegalovirus infection. *Journal of autism and developmental disorders* *34*, 583-586.

Szeles, L., Torocsik, D., and Nagy, L. (2007). PPARgamma in immunity and inflammation: cell types and diseases. *Biochimica et biophysica acta* *1771*, 1014-1030.

Tabata, T., Petitt, M., Zydek, M., Fang-Hoover, J., Larocque, N., Tsuge, M., Gormley, M., Kauvar, L.M., and Pereira, L. (2015). Human cytomegalovirus infection interferes with the maintenance and differentiation of trophoblast progenitor cells of the human placenta. *Journal of virology* *89*, 5134-5147.

Tanaka, T., Serneo, F.F., Tseng, H.C., Kulkarni, A.B., Tsai, L.H., and Gleeson, J.G. (2004). Cdk5 phosphorylation of doublecortin ser297 regulates its effect on neuronal migration. *Neuron* *41*, 215-227.

Tokuoka, S.M., Ishii, S., Kawamura, N., Satoh, M., Shimada, A., Sasaki, S., Hirotsune, S., Wynshaw-Boris, A., and Shimizu, T. (2003). Involvement of platelet-activating factor and LIS1 in neuronal migration. *The European journal of neuroscience* *18*, 563-570.

Tontonoz, P., Nagy, L., Alvarez, J.G., Thomazy, V.A., and Evans, R.M. (1998). PPARgamma promotes monocyte/macrophage differentiation and uptake of oxidized LDL. *Cell* *93*, 241-252.

Trus, B.L., Gibson, W., Cheng, N., and Steven, A.C. (1999). Capsid structure of simian cytomegalovirus from cryoelectron microscopy: evidence for tegument attachment sites. *Journal of virology* *73*, 2181-2192.

Tsai, J.W., Chen, Y., Kriegstein, A.R., and Vallee, R.B. (2005). LIS1 RNA interference blocks neural stem cell division, morphogenesis, and motility at multiple stages. *The Journal of cell biology* *170*, 935-945.

Tsutsui, Y., Kosugi, I., Kawasaki, H., Arai, Y., Han, G.P., Li, L., and Kaneta, M. (2008). Roles of neural stem progenitor cells in cytomegalovirus infection of the brain in mouse models. *Pathology international* *58*, 257-267.

Vamecq, J., and Latruffe, N. (1999). Medical significance of peroxisome proliferator-activated receptors. *Lancet (London, England)* *354*, 141-148.

Vierbuchen, T., Ostermeier, A., Pang, Z.P., Kokubu, Y., Sudhof, T.C., and Wernig, M. Direct conversion of fibroblasts to functional neurons by defined factors. *Nature* *463*, 1035-1041.

Viola, J., Lemnitzer, P., Jansen, Y., Csaba, G., Winter, C., Neideck, C., Silvestre-Roig, C., Dittmar, G., Doring, Y., Drechsler, M., *et al.* (2016). Resolving Lipid Mediators Maresin 1 and Resolvin D2 Prevent Atheroprogession in Mice. *Circulation research*.

Wada, K., Nakajima, A., Katayama, K., Kudo, C., Shibuya, A., Kubota, N., Terauchi, Y., Tachibana, M., Miyoshi, H., Kamisaki, Y., *et al.* (2006). Peroxisome proliferator-activated receptor gamma-mediated regulation of neural stem cell proliferation and differentiation. *The Journal of biological chemistry* *281*, 12673-12681.

Wang, D., and Shenk, T. (2005). Human cytomegalovirus virion protein complex required for epithelial and endothelial cell tropism. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* *102*, 18153-18158.

Wang, X., Huong, S.M., Chiu, M.L., Raab-Traub, N., and Huang, E.S. (2003). Epidermal growth factor receptor is a cellular receptor for human cytomegalovirus. *Nature* *424*, 456-461.

Wiese, C., Rolletschek, A., Kania, G., Blyszczuk, P., Tarasov, K.V., Tarasova, Y., Wersto, R.P., Boheler, K.R., and Wobus, A.M. (2004). Nestin expression--a property of multi-lineage progenitor cells? *Cell Mol Life Sci* *61*, 2510-2522.

Wright, J.F., Kurosky, A., Pryzdial, E.L., and Wasi, S. (1995). Host cellular annexin II is associated with cytomegalovirus particles isolated from cultured human fibroblasts. *Journal of virology* *69*, 4784-4791.

Wussow, F., Yue, Y., Martinez, J., Deere, J.D., Longmate, J., Herrmann, A., Barry, P.A., and Diamond, D.J. (2012). A vaccine based on the rhesus cytomegalovirus UL128 complex induces broadly neutralizing antibodies in rhesus macaques. *Journal of virology* 87, 1322-1332.

Wussow, F., Yue, Y., Martinez, J., Deere, J.D., Longmate, J., Herrmann, A., Barry, P.A., and Diamond, D.J. (2013). A vaccine based on the rhesus cytomegalovirus UL128 complex induces broadly neutralizing antibodies in rhesus macaques. *Journal of virology* 87, 1322-1332.

Wyrwicz, L.S., and Rychlewski, L. (2008). Cytomegalovirus immediate early gene UL37 encodes a novel MHC-like protein. *Acta biochimica Polonica* 55, 67-73.

Xiang, X., Osmani, A.H., Osmani, S.A., Xin, M., and Morris, N.R. (1995). NudF, a nuclear migration gene in *Aspergillus nidulans*, is similar to the human LIS-1 gene required for neuronal migration. *Molecular biology of the cell* 6, 297-310.

Yamashita, Y., Fujimoto, C., Nakajima, E., Isagai, T., and Matsuishi, T. (2003). Possible association between congenital cytomegalovirus infection and autistic disorder. *Journal of autism and developmental disorders* 33, 455-459.

Zhu, H., Cong, J.P., Yu, D., Bresnahan, W.A., and Shenk, T.E. (2002). Inhibition of cyclooxygenase 2 blocks human cytomegalovirus replication. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 99, 3932-3937.

FIGURES ET TABLEAUX

Introduction

Partie I. Le cytomégalovirus humain

Tableau 1. Classification des herpèsvirus humains.

Fig. 1. Le cytomégalovirus humain.

Tableau 2. Liste non exhaustive des manifestations pathologiques de l'infection HCMV.

Fig. 2. Nombre annuel d'enfants avec des séquelles à long terme à cause de pathologies diverses en 2009 aux USA.

Fig. 3. Fréquence des séquelles chez les enfants infectés congénitalement par le HCMV en 2009 aux USA.

Fig. 4. Nombre annuel d'enfants avec un déficit cognitif dû au HCMV aux USA en 2014.

Fig. 5. Anomalies neurologiques dues à une altération du développement du CNS à cause de l'infection CMV.

Fig. 6. Représentation schématique de la force des réponses des lymphocytes T CD4⁺ et CD8⁺ contre les différents antigènes du CMV.

Fig. 7. Résumé des stratégies de développement vaccinal contre le HCMV.

Fig. 8. Mécanisme d'entrée du HCMV par fusion membranaire.

Fig. 9. L'infection par le HCMV induit la production de COX2 et de la phospholipase A2 (cPLA) qui vont, via PGE2, réguler l'expression d'IE2

Fig. 10. Cycle viral lytique du CMV.

Fig. 11. Régulation de la latence du HCMV par remodelage du MIEP.

Fig. 12. Synthèse du 15d-PGJ2, ligand activateur de PPAR γ .

Fig. 13. Structure fonctionnelle de la protéine PPAR γ .

Fig. 14. Activation transcriptionnelle de PPAR γ , ici par le 15d-PGJ2.

Fig. 15. Rôle trans-répresseur de PPAR.

Fig. 16. Effets de l'activation de PPAR γ par son agoniste physiologique, le 15d-PGJ2 ou pharmacologiques, les thiazolidinédiones, sur les différentes cellules du système immunitaire.

Fig. 17. La régulation transcriptionnelle dépendante de PPAR γ est capitale pour de nombreux aspects du développement placentaire.

Partie II. Les cellules souches neurales

Fig. 18. Etapes schématiques du développement cérébral.

Fig. 19. Divisions symétriques et asymétriques dans les cellules neuro-épithéliales et les cellules de la glie radiaire.

Fig. 20. Structure de la protéine Nestine.

Fig. 21. L'arbre des lignages de la neuronogénèse présente de façon simplifiée les relations entre les cellules neuro-épithéliales, les cellules de la glie radiaires et les neurones.

Fig. 22. Section coronale dans le cortex cérébral en développement permettant d'illustrer les migrations radiale et tangentielle.

Fig. 23. Formation des couches du néocortex.

Fig. 24. La différenciation en neurones dépend de la division asymétrique et de la longueur de la phase G1.

Fig. 25. Corrélation entre le stade de sévérité de la lissencéphalie et les malformations cérébrales associées.

Fig. 26. Diagramme représentant l'organisation des couches corticales dans le spectre de gravité de la lissencéphalie comparé au cerveau normal.

Fig. 27. Représentation schématique du développement cortical normal ou en présence d'un défaut de nucléokinèse tel que la lissencéphalie.

Fig. 28. Les mouvements centrosomaux et nucléaires sont absents dans les neurones des patients atteints de lissencéphalie.

Fig. 29. Anomalies dans le spectre de la lissencéphalie classique dues à des mutations de *LIS1* ou *DCX*.

Fig. 30. A. Formation des couches cérébrales chez les mutants *LIS1*^{+/-}. B. Formation des couches cérébrales chez les mutants *LIS1* hétérozygotes possédant un allèle nul et un allèle hypomorphique.

Fig. 31. Cas de lissencéphalie classique due à des mutations de *LIS1* au stade 3 de sévérité comparés au cas contrôle.

Fig. 32. Cas de lissencéphalie classique ou SBH dues à des mutations de *DCX* au stade 1, 4 et 6 de sévérité, comparés au cas contrôle.

Résultats

Partie I. L'activation de PPAR γ lors de l'infection par le HCMV inhibe la neuronogénèse dans les cellules souches neurales humaines

Fig. 1. L'infection des NSC par le HCMV induit une augmentation de la phosphorylation de STAT3 de façon indépendante de la sécrétion d'IL6.

Fig. 2. L'infection par le HCMV altère la morphologie des neurones infectés.

Partie II. L'infection à HCMV induit une surexpression de LIS1 et DCX

Fig. 1. L'infection des NSC par le HCMV augmente l'expression des gènes *ACHE*, *APOE*, *PAFAH1B1* et *S100A6* et diminue l'expression des gènes *ASCL1* et *EGF*.

Fig. 2. L'infection des NSC par le HCMV augmente les niveaux d'expression de LIS1

Fig.3. L'infection augmente l'expression de la protéine DCX.

Fig. 4. L'activation de PPAR γ pourrait induire l'expression de LIS1

Fig.5. L'infection par le HCMV induit une surexpression de LIS1 *in utero*.

Fig.6. L'infection par le HCMV induit une surexpression de DCX *in utero*.

Discussion et perspectives

Fig. 7. Modèle proposé du rôle de PPAR γ , LIS1 et DCX lors de l'infection des NSC par le HCMV.

ANNEXES

RESEARCH ARTICLE

Cytomegalovirus Infection Triggers the Secretion of the PPAR γ Agonists 15-Hydroxyeicosatetraenoic Acid (15-HETE) and 13-Hydroxyoctadecadienoic Acid (13-HODE) in Human Cytotrophoblasts and Placental Cultures



Kaoutar Leghmar^{1,2,3}, Nicolas Cenac^{1,2,3}, Maude Rolland^{1,2,3}, Hélène Martin^{1,2,3}, Benjamin Rauwel^{1,2,3*}, Justine Bertrand-Michel^{4,5}, Pauline Le Faouder^{4,5}, M elinda B enard^{1,2,3,6}, Charlotte Casper^{1,2,3,6}, Christian Davrinche^{1,2,3}, Thierry Fournier^{7,8,9}, Stéphane Chavanas^{1,2,3*}

1 Centre de Physiopathologie de Toulouse Purpan, INSERM U1043, Toulouse, France, **2** CNRS U5282, Toulouse, France, **3** Université Toulouse III Paul-Sabatier, Toulouse, France, **4** MetaToul Lipidomics facility, Toulouse, France, **5** I2MC INSERM U1048, Toulouse, France, **6** Neonatal Unit, Children's Hospital, Toulouse, France, **7** INSERM UMR-S1139, Paris, France, **8** Université Paris Descartes, Paris, France, **9** PremUP, Fondation, Paris, France

OPEN ACCESS

Citation: Leghmar K, Cenac N, Rolland M, Martin H, Rauwel B, Bertrand-Michel J, et al. (2015) Cytomegalovirus Infection Triggers the Secretion of the PPAR γ Agonists 15-Hydroxyeicosatetraenoic Acid (15-HETE) and 13-Hydroxyoctadecadienoic Acid (13-HODE) in Human Cytotrophoblasts and Placental Cultures. PLoS ONE 10(7): e0132627. doi:10.1371/journal.pone.0132627

Editor: Juliet Spencer, University of San Francisco, UNITED STATES

Received: April 22, 2015

Accepted: June 16, 2015

Published: July 14, 2015

Copyright:   2015 Leghmar et al. This is an open access article distributed under the terms of the [Creative Commons Attribution License](http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/), which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original author and source are credited.

Data Availability Statement: All relevant data are within the paper and its Supporting Information files.

Funding: This work was supported by Agence Nationale de la Recherche, HCMV-PPAR-PREG, <http://www.agence-nationale-recherche.fr/>. The funder had no role in study design, data collection and analysis, decision to publish, or preparation of the manuscript.

* Current Address: School of Life Sciences and Frontiers in Genetics Program, Ecole Polytechnique F d erale de Lausanne, Lausanne, Switzerland
* stephane.chavanas@inserm.fr

Abstract

Introduction

Congenital infection by human cytomegalovirus (HCMV) is a leading cause of congenital abnormalities of the central nervous system. Placenta infection by HCMV allows for viral spread to fetus and may result in intrauterine growth restriction, preeclampsia-like symptoms, or miscarriages. We previously reported that HCMV activates peroxisome proliferator-activated receptor gamma (PPAR γ) for its own replication in cytotrophoblasts. Here, we investigated the molecular bases of PPAR γ activation in infected cytotrophoblasts.

Results

We show that onboarded cPLA₂ carried by HCMV particles is required for effective PPAR γ activation in infected HIPEC cytotrophoblasts, and for the resulting inhibition of cell migration. Natural PPAR γ agonists are generated by PLA₂ driven oxidization of linoleic and arachidonic acids. Therefore, using HPLC coupled with mass spectrometry, we disclosed that cellular and secreted levels of 13-hydroxyoctadecadienoic acid (13-HODE) and 15-hydroxyeicosatetraenoic acid (15-HETE) were significantly increased in and from HIPEC cytotrophoblasts at soon as 6 hours post infection. 13-HODE treatment of uninfected HIPEC

Competing Interests: The authors have declared that no competing interests exist.

recapitulated the effect of infection (PPAR γ activation, migration impairment). We found that infection of histocultures of normal, first-term, human placental explants resulted in significantly increased levels of secreted 15-HETE and 13-HODE.

Conclusion

Our findings reveal that 15-HETE and 13-HODE could be new pathogenic effectors of HCMV congenital infection. They provide a new insight about the pathogenesis of congenital infection by HCMV.

Introduction

Human cytomegalovirus (HCMV) is a beta herpes-virus which distribution ranges from 60 to 90% seropositive adults worldwide. HCMV infects and/or replicates in a broad spectrum of organs and cell types. Lifelong latency is established after a primary infection. Infection by HCMV is the most frequent congenital infection worldwide and a public health issue [1]. Primary infection of a seronegative mother during pregnancy, or less frequently, secondary infection in or reinfection of a seropositive mother, occurs in 0.2–2% of pregnancies and poses a 30% to 40% risk of vertical transmission to the fetus. Fetus infection may result in permanent sensorineural and neurological disabilities that affect thousands of patients each year in the USA (0.1–0.2% of all live births) [1, 2]. The most frequent permanent sequelae include mental and/or psychomotor disability, sensorineural hearing or vision loss, and/or spastic cerebral palsies, with or without orthopedic issues [3]. The direct annual costs of caring for congenitally infected patients are estimated at \$1–\$2 billion in the USA [2]. Congenital disease is more severe when primary maternal infection occurs in the first trimester. No vaccine is available and no reliable prognosis tool is available so far, except ultrasound examination of macroscopic brain abnormalities. Considering the dramatic health and societal cost of congenital HCMV infection, as well as the critical role of placenta in the disease, a better insight on its pathogenesis is urgently needed to provide new therapeutic and prognostic tools.

Not only placenta is the portal of entry of HCMV virions to fetus [4], it is also a genuine target of infection. Infection causes placenta dysfunction, which is thought to result in intrauterine growth restriction (IUGR), pre-eclampsia-like symptoms, miscarriages and probably stillbirth [5]. Also, placenta is an endocrine organ, which, if infected, may release deleterious soluble factors to the bloodstream or the fetus, such as inflammatory mediators or markers of infection. After infection of the uterus from ascending or hematogenous route, HCMV amplifies in the decidua, which refers to the endometrial stroma during pregnancy. Next, HCMV spreads to and replicates within the adjacent placenta in fibroblasts, fetal capillaries and two key placenta cell types, namely villous and extravillous cytotrophoblasts. The villous cytotrophoblasts (VCT) are epithelial progenitor cells, which underlie and differentiate to syncytiotrophoblasts (ST). STs populate the specialized syncytium layer surrounding the chorionic villi that float in maternal blood, and form the maternal-fetal exchange barrier. The extravillous cytotrophoblasts (EVCT) arise from the same progenitors than VCTs, invade the decidua, forming cell columns dedicated to anchor the placenta to the uterine wall, and drive vascular remodeling [6]. Infected placentas undergo villitis with lymphohistiocytic infiltrates. Placentas infected in early gestation show long-standing damage and fibrosis at the uterine-placental interface, which results in a hypoxic intrauterine environment [6]. In infected placentas from

patients with IUGR, significant increase in the number of large fibrinoids with avascular villi, edema, and inflammation were observed [7].

At the molecular level, we previously showed that HCMV activates peroxisome proliferator-activated receptor gamma (PPAR γ) to favor its replication in cytotrophoblasts, leading to inhibition of cytotrophoblast migration [8]. PPAR γ is a ligand-activated nuclear receptor, critical in placentation and trophoblast biology [9]. Natural PPAR γ ligands include 15-deoxy- $\Delta^{12,14}$ prostaglandin (PG) J₂ (15d-PGJ₂), 15-hydroxyeicosatetraenoic acid (15-HETE), 9- or 13-hydroxyoctadecadienoic acid (9/13-HODE) [9] (Table 1).

15d-PGJ₂ arises from hydroxylation of the precursor PGD₂. PGD₂, 15-HETE, and 9/13-HODE are generated by oxidization of arachidonic acid (AA) or linoleic acid (LA) by cyclooxygenase (COX) or 5-/15- lipoxygenase (LOX). Our previous findings raised the possibility that activation of PPAR γ in HCMV-infected trophoblast cultures could be mediated by soluble, yet unidentified, ligands [8]. Characterization of PPAR γ ligands mobilized during HCMV infection is therefore critical for a better understanding of the host cell response. Here, we investigated which ligands account for PPAR γ activation, both in the human cytotrophoblast line HIPEC [10] and in placental explants at early steps of HCMV infection.

Materials and Methods

Ethics statement

The study was performed in accordance with the French ethical guidelines and was approved by the local ethics committee of the Toulouse Children University Hospital. In this study, samples of first trimester placenta (8–11 week amenorrhea) from healthy women undergoing vaginal elective termination of pregnancy were obtained. Written informed consent was obtained from all study participants prior to sample collection. All placenta samples were anonymized before processing. Placenta samples were used only for histoculture, as described in the present article. All samples were destroyed after experimentation.

Cells, viruses and reagents

Human immortalized extravillous cytotrophoblasts (HIPEC) were propagated in DMEM/F12 (1/1; Life technologies) containing 10% fetal calf serum (Life technologies), penicillin (100 IU/ml; Life technologies) and streptomycin (100 μ g/ml; Life technologies), as described previously [10]. The human immortalized fibroblast line MRC5/CCL171 (ATCC, Manassas, VA, USA) was cultured in DMEM containing 10% bovine calf serum, penicillin and streptomycin.

We used laboratory-adapted AD169 (ATCC) or clinical VHL/E (a gift from C. Sinzger, Tübingen, Germany) HCMV strains to infect HIPEC or placenta explants, respectively. Low passage (<8 passages from the parent stock) VHL/E HCMV strains were used. For virus

Table 1. Name and abbreviation of each metabolite quantified in our study.

Compound	Formal name
PGD ₂	9 α ,15S-dihydroxy-11-oxo-prosta-5Z,13E-dien-1-oic acid
15d-PGJ ₂	11-oxo-prosta-5Z,9,12E,14E-tetraen-1-oic acid
9-HODE	(\pm)9-hydroxy-10E,12Z-octadecadienoic acid
13-HODE	(\pm)13-hydroxy-9Z,11E-octadecadienoic acid
15-HETE	15(S)-Hydroxy-5Z,8Z,11Z,13E-eicosatetraenoic acid
8-HETE	(\pm)8-Hydroxy-5Z,9E,11Z,14Z-eicosatetraenoic acid
12-HETE	12(S)-Hydroxy-5Z,8Z,10E,14Z-eicosatetraenoic acid

doi:10.1371/journal.pone.0132627.t001

production, virus stocks were collected from infected MRC5 cells when cytopathic effects were >90%. Supernatants were clarified by centrifugation at $1,500 \times g$ for 10 min, ultracentrifuged at $100,000 \times g$ for 30 min at 4°C , resuspended in culture medium, and stored at -70°C until use. Virus titers were determined upon infection of MRC5 cells by serial dilutions of the inoculum followed by immunofluorescence analysis to count the number of nuclei immunoreactive to HCMV Immediate Early antigen (IE) 24h post infection (pi)(fluorescence unit forming assay). UV irradiation of HCMV particles was performed for 30 min in a closed propylene tube with a Spectrolyne irradiator (EF-140/F fitted with a BLE-2537S bulb, Spectronics corporation, Westbury, NY). In these conditions, HCMV virions were able to infect cells, as checked by immunostaining with an antibody specific to the tegument protein pp65 (Virusys corporation, Taneytown, MD), 30 minutes post infection; the viral genome could not be expressed, as checked by the absence of immunoreactivity to the HCMV Immediate Early antigen (IE) (Argene, Verniolle, France) 24h post infection (S1 Fig).

HIPEC were infected at a multiplicity of infection of 10 unless indicated. In these conditions, approximately 80% of cells are infected 24h post infection, as assessed by the number of cells immunoreactive to an antibody specific to HCMV Immediate Early (IE) antigen (Argene) in immunofluorescence analysis. To inactivate onboarded PLA₂, viral suspensions were treated for one hour at room temperature by $50 \mu\text{M}$ methyl arachidonyl fluorophosphonate (MAFP; Enzo Lifesciences), ultracentrifuged at $100,000 \times g$ for 30 min at 4°C , washed twice with phosphate-buffered saline (PBS; Life technologies), and resuspended in culture medium. The working concentration of MAFP ($50 \mu\text{M}$) was determined by immunofluorescence analysis using HIPEC infected by HCMV particles treated by various doses of MAFP, and an antibody specific to HCMV Immediate Early (IE) antigen (Argene). Cell viability was checked by 4'6-diamino-2-phenylindole (DAPI) staining. Control viral suspensions were processed identically after incubation in the presence of the vehicle (DMSO) instead of MAFP. When HIPEC were infected with MAFP-treated virus, control uninfected HIPEC were cultured in the presence of MAFP at a concentration equivalent to that which would have been obtained without the HCMV particles washes (50 nM).

PPAR γ synthetic activator was rosiglitazone ($1 \mu\text{M}$) (Sigma), and a stimulation time of 2h was used. PPAR γ specific inhibitor was GW9662 ($2 \mu\text{M}$; Calbiochem), and cells were incubated with GW9662 one hour before infection. Optimal concentrations of rosiglitazone and GW9662 were determined from initial dose-effect experiments using the luciferase PPAR reporter plasmid (as detailed below). Cell viability was checked on the basis of Trypan blue exclusion, normal cell morphology, and absence of nuclei condensation or fragmentation using DAPI staining. The vehicle was assayed as a control in all experiments. Synthetic 15-HETE and 13-HODE were purchased (Sigma).

Onboarded cPLA₂ assay

Control, UV- irradiated, or MAFP- treated AD169 suspensions (5.10^7 infectious particles/ml) were incubated for 1h at 37°C in the presence of the fluorescent substrate bodipy-phosphatidylcholine in PBS ($100 \mu\text{M}$; Sigma). Reaction was terminated by adding one volume of PBS/butanol-1 (v/v). Samples were then vortexed and centrifuged (5 min, 4°C at $16,000 \text{ g}$). The aqueous fraction was discarded, and the remaining lipids in the butanol phase were collected, dried under nitrogen, resuspended in $20 \mu\text{l}$ of chloroform-methanol-H₂O (v/v/v), and loaded onto thin layer chromatography (TLC) plates. TLC was performed using chloroform-methanol-acetic acid-H₂O (75/45/12/6; v/v/v/v). Fluorescence was revealed under UV light. Commercially available phospholipase A2 (lecithinase from *Naja naja* venom; Sigma) was used as positive control, and 0.5 U were incubated directly with bodipy-phosphatidylcholine.

Luciferase reporter assays

We used a firefly luciferase (Luc) reporter plasmid based on a pGL4 backbone (Promega, Madison, WI, USA) and containing three PPAR responsive elements (PPREs) [8] upstream the herpes simplex thymidine kinase promoter (pGL4-PPRE-TK-luc). For normalization, we used a promoter-less renilla luciferase plasmid (pRL-null, Promega). Actively growing HIPEC were seeded in 96-well plates at a density of 25,000 cells per well. Transfection of both the reporter and normalization plasmids was performed 16 h after seeding using Genejuice transfection reagent (Novagen), according to the manufacturer's instructions. Cells were infected with HCMV, HCMV treated by MAFP beforehand, and/or stimulated with rosiglitazone (1 μ M), in the presence or absence of MAFP (50 μ M) or GW9662 (2 μ M) in the culture medium, during the 48 h following transfection. Cell lysis was performed using Cell Culture Lysis Reagent (Promega). Luciferase activity was quantified using a Centro luminometer (Berthold).

Oil Red O staining

HIPEC were treated by 10 μ M 13-HODE or by the vehicle (DMSO), fixed in formaldehyde 4% for 30 min, washed in PBS and isopropanol 30% and then incubated for 5 min with Oil Red O solution (200mg/ml) diluted in isopropanol 30% (v/v). After washing with water, nuclei were counterstained with Harris hematoxylin (1 min), washed and observed by microscopy.

Migration assays

For Wound healing assays, HIPEC monolayers (80% confluent) were infected or not by AD169 (MOI 3; non treated, UV- irradiated or MAFP- treated) in the presence or absence of GW9662 or rosiglitazone. In these conditions, using the live HCMV inoculum, approximately 50% of cells are infected 24h post infection, as assessed by the number of cells immunoreactive to an antibody specific to HCMV Immediate Early (IE) antigen (Argene) in immunofluorescence analysis. Cultures were scratched manually (three scratches per well) 6 h post infection, and left for 24 h at 37°C. The next day, pictures of the scratches were shot in bright field using an automated microscope (Apotome 2, Zeiss). Three fields were shot per condition. The coordinates of each field were saved by using a macro-command in the software driving the microscope (Zen, Zeiss), so that exactly the same field was shot at day 2. Next, pictures were analyzed by using ImageJ software [11]. The difference between the area of the scratch in each field at days 1 and 2 was measured, and represented the surface of migration of the corresponding cell monolayer (S). Last, the index of migration (IM) was determined by normalizing S of all assays respective to the value of S for the control assay. Results are expressed as the percent variation of IM relative to the control.

Transwell migration assays were performed as described elsewhere [10] with slight modifications. HIPEC were cultured for 48 h in the presence or absence of 1 μ M rosiglitazone, 2 μ M GW9662, 50 nM MAFP, or infected by live, UV-irradiated, or MAFP-treated, VHL/E HCMV at a MOI of 3. The medium was renewed after 24h. After 48h, the transwell inserts were washed three times with PBS and cells were fixed for 20 min in methanol at -20°C, washed three times with PBS, and stained with DAPI. Filters were examined and photographed on a Leica DM4000B microscope. The number of nuclei detected on the filter was determined using the ImageJ software, the Fast Morphology plug-in, and a threshold size of 400 pixels square. When required, cell clusters were resolved manually using the Cell Counter plug-in. The data were normalized to the number of nuclei obtained in the control (non infected, non treated) experiment. Two independent experiments were performed. Statistical analysis was performed using the Mann-Whitney and Kruskal-Wallis tests.

High performance liquid chromatography coupled to tandem mass spectrometry (LC-MS/MS)

LC-MS/MS was performed as detailed elsewhere [11], using HPLC grade methanol, methyl formate, and acetonitrile (Sigma–Aldrich). Deuterium-labeled lipoxin A4 (LxA4-d5), leukotriene B4 (LTB4-d4) and 5-hydroxyeicosatetraenoic acid (5-HETE-d8) (Cayman Chemicals) were mixed at a concentration of 400 ng/ml in MeOH and used as the internal standard (IS) solution. VHL/E strain was used to infect HIPEC monolayers. In all experiments, HIPEC from 10 cm² culture wells were harvested 6 h post infection in 0.2 ml of PBS, transferred to lysing matrix A (MP Biomedicals) and supplemented with 5 μ l of IS solution.

Cells were lysed using a spin homogenizer (Fastprep, MP Biomedicals) with 2 cycles of 20 sec at 5 000 rpm. 10 μ l of the lysed cell suspension were added to 200 μ l of 0.1 M NaOH for subsequent protein quantification using a Bradford assay (BioRad). The remaining of the lysate was supplemented with 200 μ l methanol, vigorously shaken, and centrifuged for 15 min at 1 000 \times g at 4°C. The supernatants were collected and stored at -80°C until lipid extraction. Lipid amounts from cell lysates were expressed in pg per mg of protein in the lysate. HIPEC culture supernatants were collected 6 hours post infection, supplemented with 300 μ l of ice cold methanol and 5 μ L of IS solution, clarified by a centrifugation at 1000g for 15 minutes, and stored at -80°C until lipid extraction. Lipid amounts from supernatants were expressed as pg/ml.

Lipid preparation from all samples was carried out through solid-phase extraction using hydrophobic polystyrene-divinylbenzene resin in dedicated 96-well plates (Chromabond multi96 HR-X 50 mg; Macherey-Nagel). After conditioning of the plate with methanol and sample loading, the plates were washed twice with H₂O/MeOH (90/10, v/v) and dried under aspiration for 15 min. Lipids were eluted with methanol (2 ml), dried under nitrogen, dissolved again in methanol (10 μ l) and transferred to liquid chromatography tubes before LC–MS/MS analysis.

LC-MS/MS analysis was performed using an UHPLC system (LC1290 Infinity, Agilent) coupled to a 6460 triple quadrupole mass spectrophotometer (Agilent Technologies) fitted with electro-spray ionization interface. Separation was done at 40°C on a Zorbax SB-C18 column (2.1 mm–50 mm–1.8 μ m) (Agilent Technologies). The compositions of mobile phase A and B were water, acetonitrile (ACN) and formic acid (FA) (75/25/0.1) and ACN, FA (100/0.1), respectively. Compounds were separated with a linear gradient from 0 to 85% B in 8.5 min and then to 100% B at 9 min. Isocratic elution continued for 1 min at 100% B, then 100% A was reached at 10.2 min and maintained to 11 min. The flow rate was 0.35 ml/min. The autosampler was set at 5°C and the injection volume was 5 μ L. Source conditions were as follows: negative ESI mode; source temperature = 325°C, nebulizer gas (nitrogen) flow rate = 10 L/min, sheath gas (nitrogen) flow rate = 12 L/min, sheath gas temperature = 400°C and spray voltage = -3500 V. Data were acquired in MRM mode. For each compound the best conditions of separation and quantification were defined: retention time in minute (RT), specific Q1/Q3 transition (T) fragmentor (F) and collision energy (CE). Peak detection, integration and quantitative analysis were performed using Mass Hunter Quantitative analysis software (Agilent Technologies). At least three independent experiments were performed, each in triplicate wells.

Placenta histoculture assays

Twelve first trimester HCMV-negative placentas (8–11 weeks amenorrhea) were obtained following elective abortions carried out by vacuum aspiration at the Paule de Viguier Hospital (Toulouse, France). Fresh placentas were processed as described elsewhere [12]. We used method B according to Lopez et al [12]. Briefly, 3 \times 10⁵ MRC5 cells were seeded in 10 cm² wells 5 days before placenta collection, and were infected by HCMV (VHL/E strain) at a MOI of 3

the day after. Collected placenta was washed with DMEM supplemented with 15% FCS, 1% penicillin-streptomycin, 0.1% gentamicin, 1% amphotericin B, and cut to obtain several villi blocks of approximately 3 mm². Blocks were placed onto sterile gelatin sponge substrates (Gelfoam) at the air-liquid interface, in 10 cm² culture wells containing infected MRC5 cells or uninfected MRC5 for the control (day 0). There was no direct contact between the MRC5 cells and the placental blocks. At day 5 post infection, the placental explants were placed into new 10 cm² wells without supporting MRC5 layer, washed three times with PBS, and left in fresh culture medium. The culture media were collected at days 6 and 12 post infection and stored at -80°C until lipid analysis

Statistical analysis

Statistical analyses were performed with the StatEL plugin (Adscience) for Excel (Microsoft) using Kruskal-Wallis test, except for data from placenta histoculture assays, which were analyzed with the Prism program (Graphpad) using the Wilcoxon test. Error bars are SEM. p values <0.05 or less were considered significant.

Results

HCMV particles carry onboarded cPLA₂ activity

We first investigated the biochemical bases of the generation of PPAR γ agonists derived from polyunsaturated fatty acids (PUFA) in infected HIPEC. Release of arachidonic acid (AA) and linoleic acid (LA) from membrane glycerophospholipids is catalytically driven by calcium-dependent phospholipase A₂ (cPLA₂) [13]. It has been demonstrated that HCMV particles carry an onboarded, host cell-derived cPLA₂ activity (oPLA₂), required for virus replication [14]. We hypothesized that oPLA₂ delivered to the infected cell could contribute to the biosynthesis of PPAR γ activators. Since UV-irradiated HCMV does not activate PPAR γ in HIPEC [8], we first investigated whether UV irradiation abolished oPLA₂ activity in HCMV particles (Fig 1A). To determine whether HCMV virions carried active oPLA₂, we examined the hydrolysis of a fluorescent bodipy-phosphatidylcholine substrate (B-PC) to bodipy-lysophosphatidylcholine (B-LPC) when incubated in the presence of HCMV particles. In this assay, generation of B-LPC thus indicates PLA₂ activity. Thin layer chromatography showed B-LPC generation from B-PC incubated with native HCMV particles (Fig 1A). PLA₂ activity was detected from B-PC incubated with UV-irradiated HCMV particles, indicating that UV irradiation did not inactivate this oPLA₂ (Fig 1A). In contrast, HCMV particles treated beforehand by the specific PLA₂ inhibitor methyl arachidonyl fluorophosphonate (MAFP) showed efficient inhibition of oPLA₂ (Fig 1A). These data show that HCMV particles actually carry onboarded cPLA₂, which is sensitive to inhibition by MAFP, but not to UV irradiation. Therefore, we used MAFP to inactivate oPLA₂ in subsequent experiments.

Onboarded cPLA₂ activity is required for effective PPAR γ activation and for inhibition of HIPEC migration

We had previously shown that only transcriptionally competent HCMV particles were able to cause PPAR γ activation in HIPEC [8]. It was however unknown whether lipid mediators generated from LA or AA through oPLA₂ activity actually contribute to PPAR γ activation. Hence, we investigated whether MAFP-treated HCMV particles were able to activate PPAR γ in HIPEC by using a PPAR γ -reporter luciferase assay (Fig 1B). As expected, infection by native HCMV particles induced a dramatic and significant (p<0.01) increase in PPAR γ activity in HIPEC (Fig 1B). Likewise, stimulation of uninfected HIPEC by the selective PPAR γ ligand

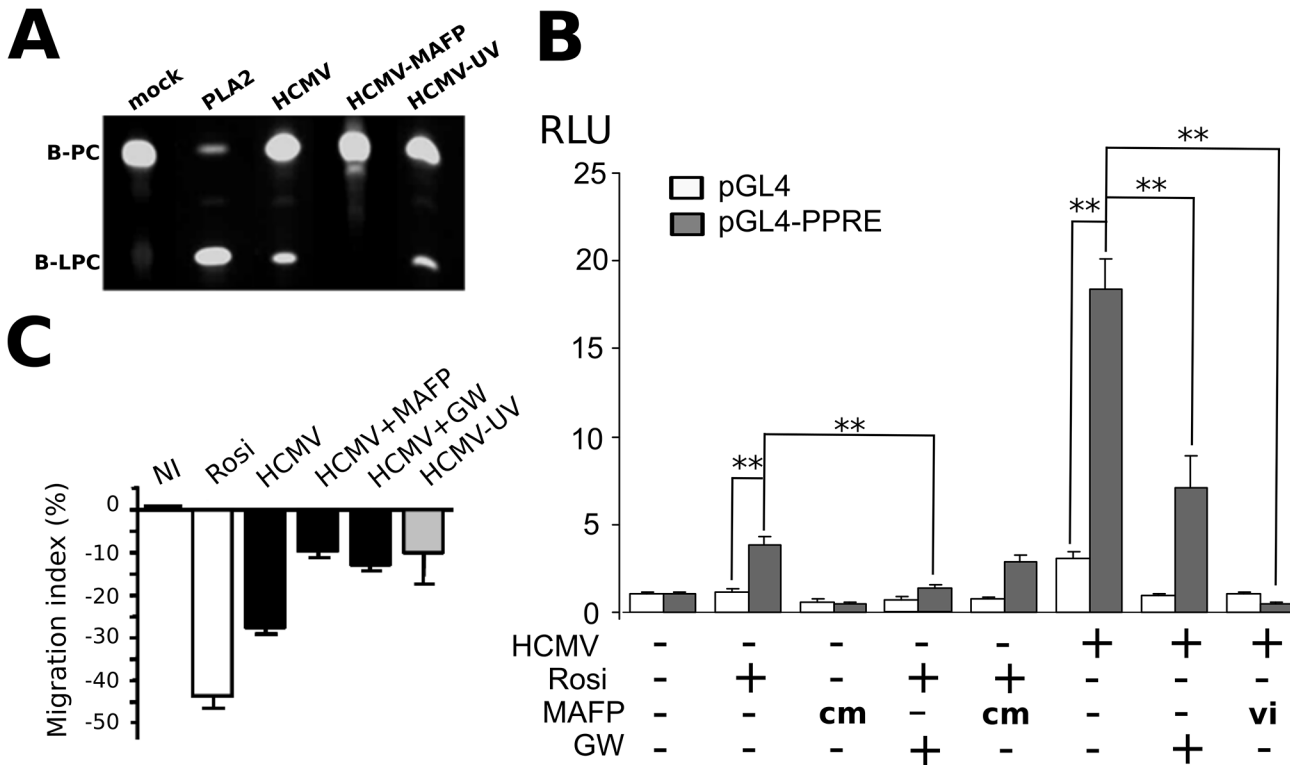


Fig 1. Onboarded cPLA₂ is required for PPAR γ activation and inhibition of cytotrophoblast migration. (A) TLC analysis of bodipy-phosphatidylcholine (B-PC) incubated in the presence of buffer (mock), purified PLA₂ (PLA2), native HCMV particles (HCMV), HCMV particles pre-treated by MAFP (HCMV+MAFP) or UV-irradiated (HCMV-UV). (B) PPAR γ activity luciferase assay performed with HIPEC in various conditions, using a reporter plasmid responsive to PPAR γ (pGL4-PPRE) or a control plasmid (pGL4), 48 h pi or post treatment onset. HCMV: HIPEC infected by live HCMV particles; vi: the viral inoculum was treated beforehand by MAFP; cm: control with 50 nM MAFP in the culture medium; GW: PPAR γ inhibitor GW9662; Rosi: PPAR γ agonist rosiglitazone. RLU: relative luciferase units; **: $p < 0.01$ (Kruskal-Wallis test). The assay was repeated twice. (C) Wound-healing assays. HCMV+MAFP: the viral inoculum was treated beforehand by MAFP; HCMV+GW: the HIPEC were infected in the presence of GW9662; HCMV-UV: the viral inoculum was UV-irradiated. Results are expressed as the percent variation relative to the control. The figure shows results of a representative experiment, out of two independent experiments, each comprising triplicate measures. NI: non-infected.

doi:10.1371/journal.pone.0132627.g001

rosiglitazone [15] also resulted in significant activation (Fig 1B). PPAR γ activation was strongly and significantly inhibited when HIPEC were cultured in the presence of the PPAR γ selective ligand GW9662 [16], even if stimulated by rosiglitazone or infected by live HCMV (Fig 1B). We also investigated the effect of MAFP treatment of HCMV particles upon PPAR γ activation in HIPEC. In our system, it is very unlikely that HIPEC had been in contact with active doses of MAFP, since viral particles were carefully washed by ultracentrifugation before being used to infect HIPEC. In any event, to rule out any effect from possible contaminant MAFP in the inoculum, we performed control assays with uninfected HIPEC in the presence of MAFP at a concentration equivalent to that would have been obtained without the HCMV particles wash, i.e., 50 nM. We found no detectable effect of MAFP on PPAR γ activity in these control assays (Fig 1B). In contrast, we observed that infection of cytotrophoblasts with MAFP-treated HCMV particles abolished PPAR γ activation associated with infection (Fig 1B). These findings suggested that oPLA₂ activity from HCMV particles is required for effective PPAR γ activation in HIPEC.

We further explored the impact of oPLA₂ on infected HIPEC. We previously reported that PPAR γ activation in HIPEC impairs cell migration, should PPAR γ be activated by rosiglitazone stimulation or HCMV infection [8]. Therefore, we investigated whether MAFP-treated

HCMV particles altered HIPEC migration abilities by using wound-healing assays (Fig 1C). Infection of cytotrophoblasts with MAFP-treated HCMV particles decreased PPAR γ -dependent inhibition of cell migration in a manner similar to that caused by UV irradiation of the inoculum, or by treatment of HIPEC with the PPAR γ synthetic inhibitor, GW9662 (Fig 1C). Altogether, these results suggest that oPLA₂ is required for PPAR γ activation and inhibition of cytotrophoblast migration.

15-HETE and 13-HODE are the predominant PUFA-derived agonists of PPAR γ in infected HIPEC

We next hypothesized that oPLA₂ activity contributes to the biosynthesis of PPAR γ ligands in infected HIPEC. This prompted us to search for PPAR γ activating lipids generated in HIPEC at early stages of infection. To identify putative PPAR γ activators generated among AA or LA metabolites, we used a novel, rapid and sensitive method based on high performance liquid chromatography coupled to tandem mass spectrometry (LC-MS/MS) [11] using lysates and conditioned culture media collected at 6 hours pi (Fig 2A). Candidate PPAR γ agonists were 9/13-HODE, 15-HETE, and 15d-PGJ₂. We also investigated the amounts of other PUFA-derived lipids: 8/12-HETE, which have not been identified as PPAR γ agonists to date, and PGD₂, because it is the precursor of 15d-PGJ₂. The optimal conditions determined for lipid separation for each compound are provided (Table 2).

For each metabolite, we also determined retention time, line equation, coefficient of determination, maximum percent residual, limit of detection and quantification (Table 3).

LC-MS/MS analysis revealed a wide range of PUFA-derived lipids in HIPEC or in conditioned culture media (Fig 2A). No PGD₂, 15d-PGJ₂, or 8/12-HETE could be detected from the culture supernatants of infected or control HIPEC (Fig 2A). There was no change in the amounts of 15d-PGJ₂ or 8/12-HETE in infected HIPEC as compared to the uninfected controls (Fig 2A). Likewise, no significant change was observed in levels of cellular or secreted 9-HODE in infected HIPEC as compared to the controls (Fig 2A). In contrast, we found moderately but significantly increased levels (approximately 1.5 fold) of 15-HETE in lysates ($p < 0.02$) or supernatants ($p < 0.029$) from HCMV-infected HIPEC as compared to the uninfected controls (Fig 2A). 15-HETE amounts in uninfected control cell lysates were detected at 459 pg (1.4 pmol) per mg of protein and rose to 659 pg (2 pmol) per mg of protein in infected HIPEC. In the conditioned culture supernatants, these amounts were measured at 164 pg/ml (0.5 nM) in uninfected cultures, compared to 316 pg/ml (0.9 nM) in infected cultures. In addition, LC-MS/MS analysis revealed a strong (> 2.4 fold) and significant ($p < 0.021$) increase in the mean amount of 13-HODE secreted from HCMV-infected HIPEC (Fig 2A). Indeed, amounts of 13-HODE were far greater than that of 15-HETE. Secreted 13-HODE amounts in supernatants ranged from 282 pg/ml (0.9 nM) in uninfected HIPEC cultures to 3,056 pg/ml (9.8 nM) in infected HIPEC cultures. We also observed a significant, albeit moderate (>1.4 fold, $p < 0.026$), increase in the mean amount of 13-HODE in infected HIPEC lysates (Fig 2A). Cytoplasmic 13-HODE amounts ranged from 1,091 pg/mg of protein (3.7 nM) in uninfected HIPEC to 1,674 pg/mg of protein (5.6 nM) from infected HIPEC (Fig 2A). Amounts of 13-HODE and 15-HETE were not significantly different from uninfected controls when the inoculum was irradiated by UV light (Fig 2A). In contrast, infection by HCMV particles treated beforehand by MAFP abolished the increase in the quantity of secreted 13-HODE and 15-HETE 6 h pi (Fig 2B), indicating that active oPLA₂ is needed for their efficient biosynthesis.

13-HODE and 15-HETE have been well characterized as *bona fide* PPAR γ agonists [9, 17]. We nevertheless verified the ability of such PUFA-derived agonists to activate PPAR γ in HIPEC, using 13-HODE as a model. Treatment of uninfected HIPEC by 10 nM 13-HODE

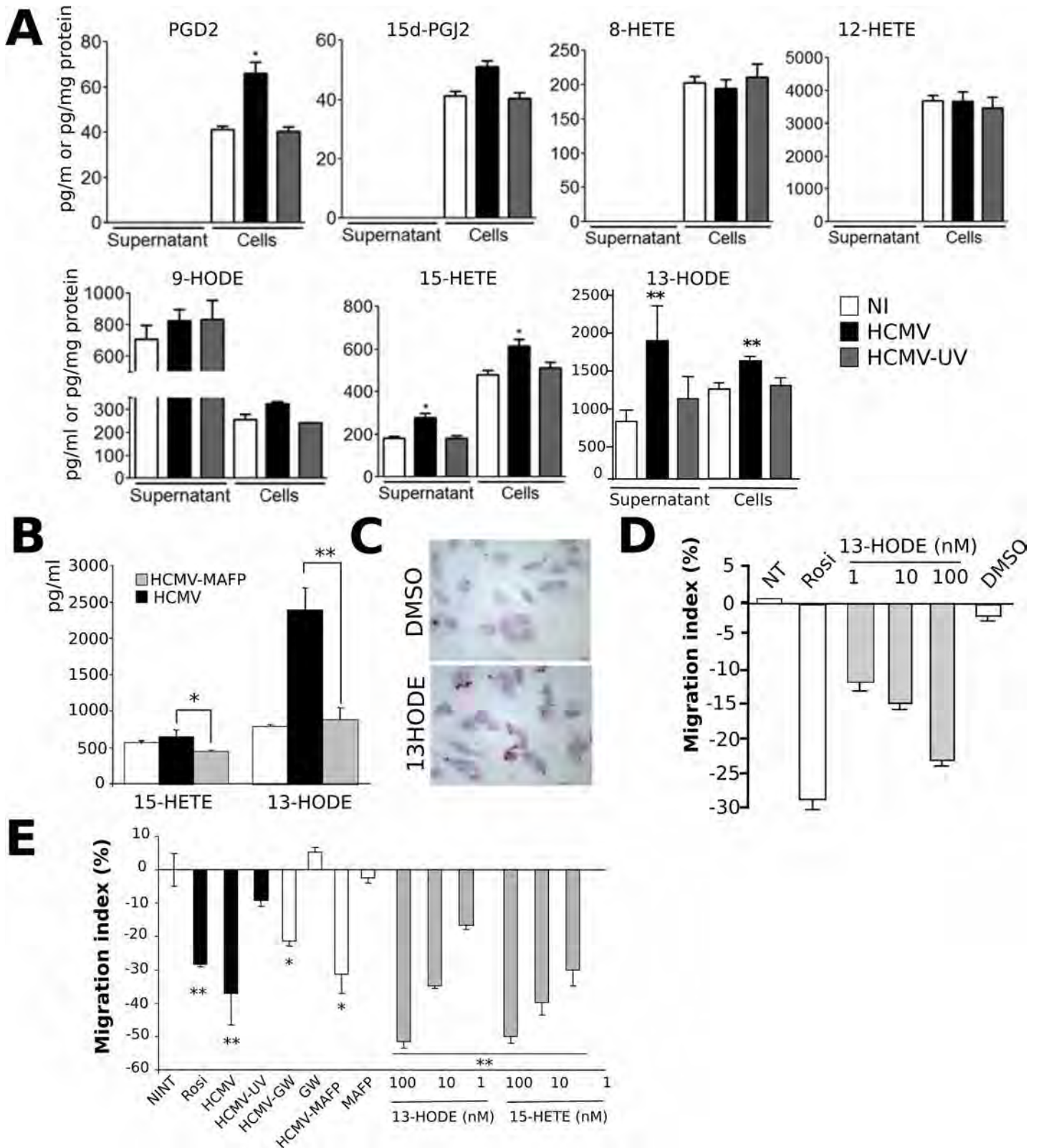


Fig 2. 15-HETE and 13-HODE are released by HIPEC infected by live HCMV. (A) LC-MS/MS analysis of the PUFA-derived lipids in HIPEC uninfected (NI), infected with live HCMV (HCMV) or UV-irradiated HCMV (UV-HCMV) (expressed as pg/mg of protein) and from the corresponding culture supernatants (expressed as pg/ml). (B) LC-MS/MS analysis of 13-HODE and 15-HETE in the culture medium of HIPEC uninfected (NI), infected by live HCMV (HCMV) or

by HCMV treated by MAFP (HCMV-MAFP). (C) Red Oil O staining of uninfected HIPECs stimulated by 13-HODE or treated by the vehicle (DMSO). (D) Wound healing assay using uninfected HIPEC treated by different doses of 13-HODE, rosiglitazone (Rosi), or the vehicle (DMSO), or untreated (NT). The results shown are from one representative experiment, out of two independent experiments, each comprising triplicate measures. (E) Transwell migration assay using uninfected HIPEC or HIPEC infected by live HCMV (HCMV), UV-irradiated HCMV (HCMV-UV) or HCMV treated by MAFP (HCMV-MAFP) (MOI = 3), in the presence or the absence of 1 μ M rosiglitazone, 2 μ M GW9662 (GW), 50 nM MAFP (MAFP), or 13-HODE (13-HODE) or 15-HETE (15-HETE) at various concentrations (nM). Shown are the results of two independent experiments. *: $p < 0.05$; **: $p < 0.01$; ***: $p < 0.001$.

doi:10.1371/journal.pone.0132627.g002

induced accumulation of lipid droplets, indicative of active PPAR γ (Fig 2C). We also checked whether 13-HODE and/or 15-HETE treatment altered the migratory properties of HIPEC. Preliminary wound healing assays showed that treatment of uninfected HIPEC by 13-HODE reduced cell migration in a dose-dependent manner, recapitulating the effect of infection, similarly to rosiglitazone stimulation (Fig 2D). Because HIPEC retain the invasive properties of primary EVCT [10], we next investigated the outcomes of 13-HODE or 15-HETE treatment on HIPEC migration capacities using transwell migration assays. As expected, a significant decrease in migration was found in infected HIPEC ($p < 0.0015$) or uninfected HIPEC stimulated by rosiglitazone ($p < 0.0065$) as compared to the uninfected, untreated controls (Fig 2E). This inhibition of migration was strongly attenuated when HIPEC were infected by live HCMV in the presence of the PPAR γ inhibitor GW9662 (Fig 2E). Treatment of HIPEC by GW9662 or MAFP, or culture of HIPEC in the presence of UV irradiated HCMV did not result in any significant change in migration as compared to the control (Fig 2E). GW9662 treatment caused a slight, albeit non significant ($p < 0.73$), increase in migration, probably through inhibition of basal PPAR γ activity in HIPEC. Noteworthy, incubation of HIPEC in the presence of MAFP-treated HCMV showed a significant decrease in migration as compared to the uninfected control ($p < 0.034$) (Fig 2E), possibly because of endogenous PLA $_2$ activity substituting for that of oPLA $_2$ within the 48 hours of incubation. Lastly, stimulation by 13-HODE or 15-HETE resulted in significant, dose-dependent, impairment of migration as compared to the unstimulated controls ($p < 0.004$), what confirmed that 13-HODE and 15-HETE showed anti-migratory properties upon HIPEC.

Placenta histocultures secrete increased amounts of 15-HETE and 13-HODE when infected by HCMV

Next, we investigated which PPAR γ activator lipids are released upon infection by HCMV using a model closer to the physiological context. To this aim, we used an histoculture model

Table 2. Optimal conditions for lipid separation by LC-MS/MS.

Compounds	Q1/Q3 transition	Fragmentor (V)	Collision energy (V)
LxA4-d5*	356/115	100	6
PGD $_2$	351/271	100	12
15d-PGJ $_2$	315/271	90	2
LTB4-d4*	339/197	120	6
13-HODE	295/195	140	8
9-HODE	295/171	135	8
15-HETE	319/219	110	2
12-HETE	319/208	110	2
8-HETE	319/155	110	4
5-HETE-d8*	327/155	100	2

* Deuterated compound used as an internal standard.

doi:10.1371/journal.pone.0132627.t002

Table 3. Retention time (RT), line equation, coefficient of determination (r²), maximum percent residual, limit of detection (LOD), limit of quantification (LOQ) and attributed internal standard (IS) for each metabolite.

Compound name	RT min	Equation	r ²	Max % Residual	LOD ng/mL	LOQ ng/mL	IS
PGD ₂	3.87	y = 1.767076 * x + 1.199E-005	0.9996	1.872	0.24	0.49	LxA4-d5
15d-PGJ ₂	7.60	y = 4.119598 * x—5.150E-004	0.9978	10.177	0.24	0.49	LTB4-d4
9-HODE	7.99	y = 0.451368 * x + 8.281E-004	0.9997	3.420	0.12	0.24	5HETE-d8
13-HODE	7.96	y = 0.550079 * x + 0.0017	0.9966	3.980	0.48	0.98	5HETE-d8
15-HETE	8.19	y = 0.438428 * x—2.109E-005	0.9970	5.427	0.48	0.98	5HETE-d8
8-HETE	8.48	y = 0.322877 * x + 2.779E-005	0.9992	2.816	0.48	0.98	5HETE-d8
12-HETE	8.50	y = 0.095890 * x + 9.751E-005	0.9974	3.450	1.90	3.60	5HETE-d8

doi:10.1371/journal.pone.0132627.t003

of normal human placental explants that can be infected ex vivo by HCMV and that we described elsewhere [12]. First trimester placenta blocks were obtained from 12 donors and cultured 5 days at the air-liquid interface in the presence of VHL/E-HCMV-producing MRC5 fibroblasts to allow efficient infection. At day 6, placental explants were transferred to MRC5-free culture wells for 1 day or 6 days before culture supernatants were collected for lipid analysis. We used explants from first trimester placenta, since they contain a greater number of invasive extravillous cytotrophoblasts than later stages and because congenital HCMV infection during first trimester confers the most damage to the placenta and/or the fetus. We thus assumed that early placental explants were more likely to recapitulate the situation in vivo. Indeed, we found that only placenta explants growing on supporting infected MRC5 layer could be efficiently infected by HCMV. MRC5 showed no productive infection when the viral inoculum was either UV irradiated or MAFP treated beforehand. 8/12/15-HETE 9/13-HODE, PGD₂ and 15d-PGJ₂ were detectable by LC-MS/MS from 24 hours post installation of the explants in the MRC5-free wells (Fig 3). Although baseline levels were variable among donors, we observed significantly greater amounts of secreted 15-HETE (p< 0.029) and 13-HODE (p< 0.008) in the infectious context when compared to those from the same donor installed on uninfected MRC5, with levels increasing from 1,250 pg/ml (4.2 nM) to 14,600 pg/ml (49 nM) (for 13-HODE) or from 1,007 pg/ml (3 nM) to 14,239 pg/ml (44.5 nM)(for 15-HETE) at day 6 post installation (Fig 3). Statistical analysis confirmed that secreted levels of 13-HODE and 15-HETE were significantly greater in the infected explants as compared to the controls (p< 0.01 and p<0.05, respectively). At day 12, we observed no significant difference in the amounts of 15-HETE or 13-HODE from the histocultures placed in the infectious context as compared as the controls, although their mean values were greater than those at day 1 pi (Fig 3). This suggested that increased amounts at day 12 did not result from increasing number of infected cells within the placenta explants. More importantly, this indicated that secretion of 15-HETE and 13-HODE were rather associated with early stages of infection. In contrast, amounts of PGD₂, 15d-PGJ₂, 8/12-HETE and 9-HODE were not increased in infected histocultures, at day 6 or 12 (Fig 3A). HCMV infection of the placental explants was checked by immunohistological staining using the antibody specific to IE. Infected explants, but not control explants, showed clear IE immunoreactivity in endothelial, stromal and, mostly, in cytotrophoblasts cells (Fig 3B). Our findings suggest that infection of early placenta results in enhanced secretion of 13-HODE and 15-HETE.

Discussion

Congenital infection by HCMV is the most frequent congenital infection and accounts for devastating sensorineural and neurodevelopmental sequelae in the severe cases. It also causes

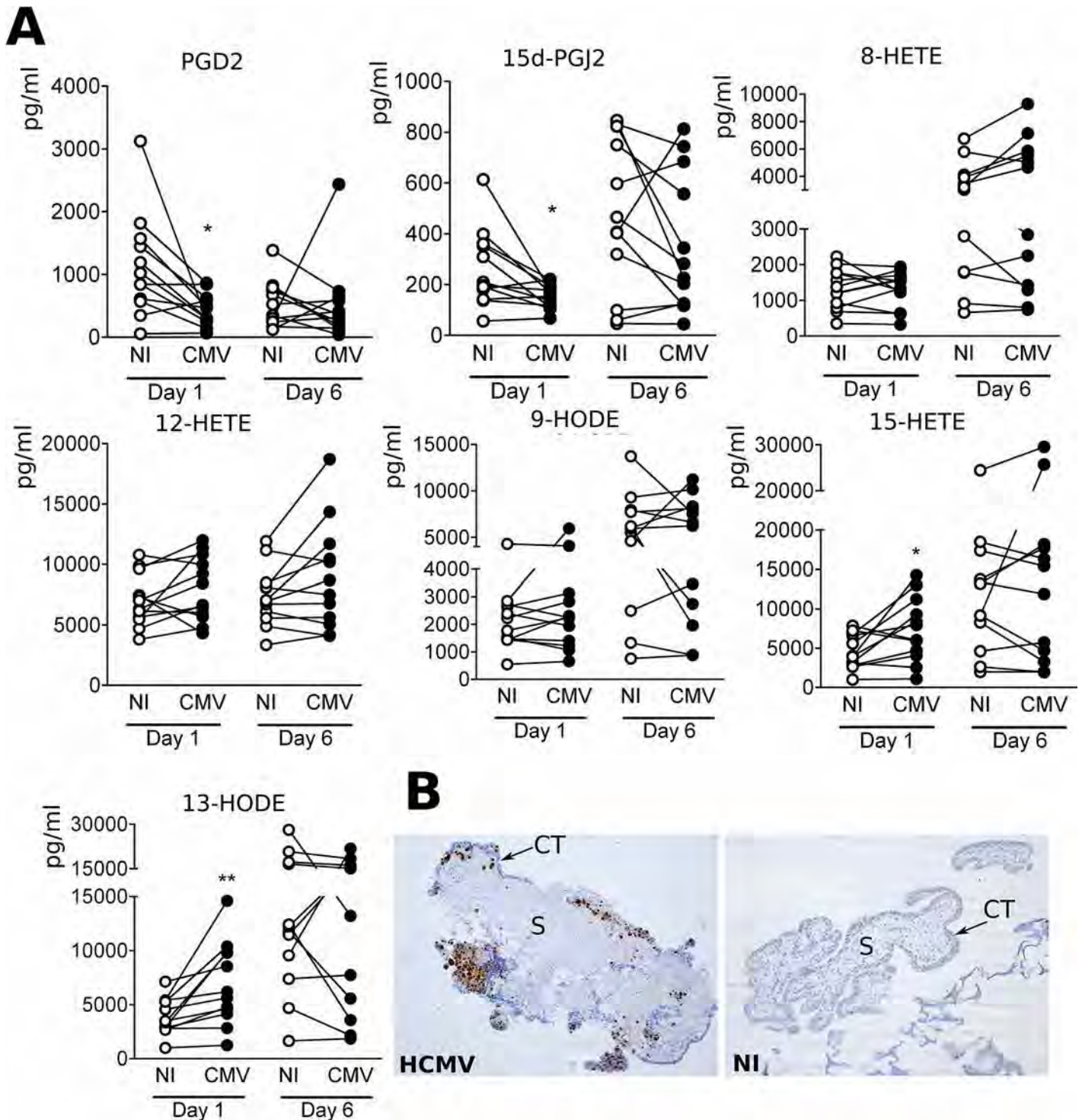


Fig 3. Increased amounts of 15-HETE and 13-HODE secreted by from early placenta explants infected by HCMV. (A) LC-MS/MS analysis of the amounts of PUFA-derived lipids secreted from histocultures from 12 first trimester placentas either infected by HCMV (CMV) or uninfected (NI). *: $p < 0.05$; **: $p < 0.01$ (Wilcoxon test). (B) Immunostaining analysis of HCMV antigen IE in infected (HCMV) or uninfected (NI) placental explants cultured ex vivo. Representative views are shown. Note the positive, nuclear IE staining in the cytotrophoblast layer (ST) surrounding the villus stroma (S).

doi:10.1371/journal.pone.0132627.g003

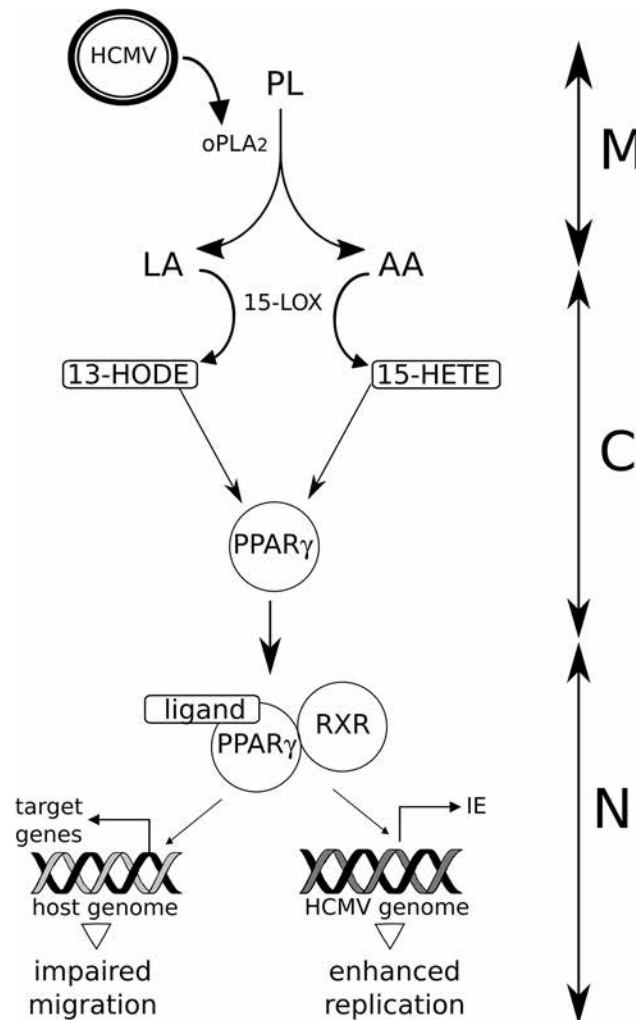


Fig 4. Proposed model of PPAR γ activation in HCMV infection of placental cells. HCMV particles (HCMV) carry onboarded cPLA2 (oPLA2) which catalyzes linoleic acid (LA) and arachidonic acid (AA) release from host membrane phospholipids (PL). AA and LA undergo oxidization driven by 15-lipoxygenase (15-LOX), which generates 15HETE and 9-HODE, respectively. 15HETE and 9-HODE are activating ligands of PPAR γ , which dimerizes with RXR to regulate the expression of the host and virus genomes, resulting in impaired migration abilities in vitro, and enhanced IE transcription and viral replication. M: cell membrane, C: cytoplasm, N: nucleus.

doi:10.1371/journal.pone.0132627.g004

placenta dysfunction, which can be associated with pre-eclampsia (PE) like symptoms, IUGR or even stillbirths, and may threaten other organs through the deleterious action of secreted soluble mediators. Given the dramatic health and societal cost of congenital HCMV infection, a better insight on its pathogenesis is needed to provide new therapeutic or prognostic tools. Based on our previous demonstration that PPAR γ activation is an early and key effector of HCMV infection in cytotrophoblast cells [8], the goal of this study was to gain novel insight about the modalities of PPAR γ activation upon infection. Here, using newly-developed lipidomic approaches, we demonstrate that 15-HETE and 13-HODE are released by HIPEC and placental explants during the early steps of HCMV infection (Fig 4).

In this study, we used two HCMV strains, the laboratory-adapted AD169 and the clinical strain VHL/E. The former harbors a 20-kb genomic deletion which makes the later a more

relevant model given that it is used at low passages of amplification. Notably, we found similar results respective to PPAR γ activation, HIPEC migration, and onboarded PLA $_2$ with AD169 HCMV than what had been reported before with VHL/E HCMV [8, 14]. However, to carry out the LC-MS/MS screening, the experimental procedure and the relatively lower efficiency of producing VHL/E stocks as compared to AD169 prevented us to use low passage VHL/E suspensions. Therefore we elected to use AD169 rather than generate high passage VHL/E for the initial screening in HIPEC, and we used low passage VHL/E for the screening in placental explants. Noteworthy, 13-HODE and 15-HETE were the predominant lipids generated by HIPEC infected by AD169 and by placental explants infected with VHL/E respectively. Also, the results of transwell migration assays, performed with HIPEC infected by VHL/E HCMV, supported those found in wound healing experiments with AD169. Together, these data suggest that AD169 genome alterations do not result in detectable changes respective of HIPEC permissivity and migration abilities, PPAR γ activation and 13-HODE and 15-HETE generation.

HIPEC are SV-40 immortalized human EVCT [10]. As such, they probably bear transcriptome or genomic alterations. We failed to generate primary or secondary cultures of EVCT, even from early placentas. Therefore, we elected to investigate the outcomes of infection in placenta explants, a model more relevant to pathophysiology. Noteworthy, the results of the lipid screen using HIPEC and placental explants were similar, showing increased biosynthesis of 13-HODE and 15-HETE in infected explants. However, the limitation of this study is the impossibility to figure out which cell type(s) within the placenta explants actually generate(s) 13-HODE or 15-HETE, or to rule out the possibility of bystander stimulation of 13-HODE / 15-HETE biosynthesis between neighbor cell types within the placental explants.

The amounts of secreted 15-HETE were found at least 2 fold lower than those of cellular 15-HETE. We assumed that this could result from either low levels of secretion or poor stability in the medium. The amounts of both cellular and secreted 13-HODE appeared much greater than those of 15-HETE (> 3 fold), indicating more efficient biosynthesis and/or secretion.

We showed that PLA $_2$ activity supplied by the virus (oPLA $_2$) is mandatory for 15-HETE and 13-HODE production, consistent with the fact that PLA $_2$ drives AA and LA release from membrane phospholipids. We have previously reported that UV-irradiated HCMV could not activate PPAR γ in HIPEC [8]. However, we showed here that UV irradiation had no impact on either oPLA $_2$ activity, using TLC analysis of HCMV particle lysates (Fig 1A), or on 13-HODE or 15-HETE biosynthesis, by LC-MS/MS analysis using HIPEC infected by UV-irradiated HCMV (Fig 2A). These findings suggest that oPLA $_2$ is indeed required, but is not sufficient to trigger PPAR γ activation in HIPEC. Viral gene expression seems to be required, possibly through the production of immediate early transcripts that remain to be investigated. These may, in turn, modulate downstream stages of the cascade leading to 15-HETE or 13-HODE biosynthesis.

The present study underscores the role of 15-LOX in HCMV-infected placenta, since 15-LOX is a shared catalytic driver of oxidization of AA or LA that leads to 15-HETE and 13-HODE synthesis. The 15-LOX pathway has been extensively investigated as a key regulator of healthy and pathological vascular system, including vascular plasticity and remodeling; it has been described as critical in the generation as well as the resolution of inflammation; and it has been reported to exert pro-atherosclerotic and anti-atherosclerotic effects [18].

15-HETE was originally identified as a PPAR γ agonist in monocytes and macrophages [19, 20], and, as such, could contribute to the anti-inflammatory role of the receptor [21]. 15-HETE is associated with PE or vascular pathogeny in a number of studies, and it has been reported to exert important roles in umbilical cord vasoconstriction and vascular remodeling associated with PE [22]. Increased release of 15-HETE in the placenta and in the venous and umbilical

cord sera of patients with PE have been reported [23, 24], consistently with increased 15-LOX activity in placenta from PE patients [22]. 15-HETE has been shown to promote HUVEC endothelial cell line proliferation and migration [24]. Here, we found increased release of 15-HETE in histocultures from healthy placenta infected by HCMV *ex vivo*, outside any context of PE. This finding suggests that 15-HETE secreted in placenta in response to HCMV may have a causative role in PE symptoms associated with congenital HCMV infection. 15-HETE also enhances the expression of placenta growth factor (PLGF) [25]. PLGF is abundantly expressed by trophoblasts and has been proposed to modulate vascular development, stability, and/or function, within the decidua and placental villi [26]. The receptor for PLGF on trophoblast, called *fms*-like tyrosine kinase (*flt-1*) receptor, exists as a soluble form, *s-flt-1*. Strikingly, *s-flt-1* levels are increased in the amniotic fluid of patients with congenital HCMV infection [27], and could thereby represent a negative modulation of excessive PLGF signal due to increased levels of 15-HETE resulting from HCMV infection. Besides, 15-HETE appeared to be also a negative regulator of 15-LOX isoform 2 gene expression through an autocrine feedback loop involving binding onto the 15-LOX-2 gene promoter of PPAR γ activated by 15-HETE [28]. Lastly, 15-HETE is an endogenous regulator of prostacyclin, a prostanoid which is a key regulator of vascular homeostasis during pregnancy in particular [29].

13-HODE was originally identified as a strong PPAR γ ligand in the monkey kidney cell line CV1 and in human macrophages [20]. Hence, similar to 15-HETE, 13-HODE contributes to the anti-inflammatory role of the receptor [21]. In human trophoblasts, 13-HODE was previously reported to increase human chorionic gonadotropin production but showed no effect on the differentiation markers syncytin, cyclin E or p27 [17]. In addition to linoleic acid, oxidized low-density lipoproteins (oxLDL) are a natural source of 13-HODE [30–32]. 13-HODE might play a role in the inhibition of trophoblast invasion mediated by oxidized LDLs [33]. 13-HODE can also modulate the immunological function of oxLDL: notably, the capacity of oxLDL to generate activating dendritic cells from differentiating monocytes was shown to be inhibited by the presence of 13-HODE [34]. 13-HODE is also an activating ligand of the transient receptor potential vanilloid type 1 (TRPV1), a non-selective cation channel with a wide distribution throughout the central and peripheral nervous systems [35, 36]. TRPV1 integrates painful stimuli, though the role of 13-HODE as such a mediator of inflammatory pain responses remains unclear [37]. It has been proposed that PPAR γ may be involved in the pathophysiology of IUGR and/or PE [38]. In PE, lipid deposition in maternal spiral arteries, namely acute atherosclerosis, resembles early stages of atherosclerosis [39]. Yet, 13-HODE shows atherogenic activity and LDLs are abundant in atherosclerotic lesions [30]. Therefore, it is tempting to speculate that 13-HODE production might have a role in the onset of PE-like symptoms.

In conclusion, we reveal that HCMV-infected HIPEC cytotrophoblasts and placental explants release predominantly increased amounts of 15-HETE and 13-HODE, two PUFA-derived mediators that lie at the crossroads of a number of pathways modulating inflammation as well as vasculature, during pregnancy.

Supporting Information

S1 Fig. UV irradiation of HCMV particles does not prevent infection but abolishes expression of the viral genome. Shown are representative immunofluorescence analyses of the input HCMV tegument protein pp65 (pp65), performed 30 min post infection (pi) and of the HCMV Immediate Early antigen (IE), performed 24 hours pi, in HIPEC infected by live HCMV (live) or HCMV irradiated by UV light (UV), at a MOI of 3, or uninfected HIPEC (NI). Scale bar: 25 μ m.
(TIFF)

Acknowledgments

The authors wish to thank Florence Capilla for expertise in histology, Daniel Dunia for helpful discussions, and the staff of the obstetric department of the Toulouse University Hospital for help with specimen collection.

Author Contributions

Conceived and designed the experiments: KL CD SC. Performed the experiments: KL MR HM SC NC PL JBM. Analyzed the data: KL SC NC CD. Contributed reagents/materials/analysis tools: BR TF CC MB. Wrote the paper: SC CD KL.

References

1. Boppana SB, Ross SA, Fowler KB. Congenital Cytomegalovirus Infection: Clinical Outcome. *Clinical Infectious Diseases*. 2013; 57(suppl 4):S178–S81. doi: [10.1093/cid/cit629](https://doi.org/10.1093/cid/cit629) PMID: [24257422](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/24257422/)
2. Cannon MJ. Congenital cytomegalovirus (CMV) epidemiology and awareness. *J Clin Virol*. 2009; 46 Suppl 4:S6–10. PMID: [19800841](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/19800841/). doi: [10.1016/j.jcv.2009.09.002](https://doi.org/10.1016/j.jcv.2009.09.002)
3. Cheeran MCJ, Lokensgard JR, Schleiss MR. Neuropathogenesis of congenital cytomegalovirus infection: disease mechanisms and prospects for intervention. *Clin Microbiol Rev*. 2009; 22(1):99–126, Table of Contents. doi: [10.1128/CMR.00023-08](https://doi.org/10.1128/CMR.00023-08) PMID: [19136436](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/19136436/)
4. Fisher S, Genbacev O, Maidji E, Pereira L. Human cytomegalovirus infection of placental cytotrophoblasts in vitro and in utero: implications for transmission and pathogenesis. *J Virol*. 2000; 74(15):6808–20. PMID: [10888620](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/10888620/).
5. Pereira L. Have We Overlooked Congenital Cytomegalovirus Infection as a Cause of Stillbirth? *Journal of Infectious Diseases*. 2011; 203(11):1510–2. doi: [10.1093/infdis/jir126](https://doi.org/10.1093/infdis/jir126) PMID: [21592978](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/21592978/)
6. Pereira L, Maidji E, McDonagh S, Tabata T. Insights into viral transmission at the uterine-placental interface. *Trends in Microbiology*. 2005; 13(4):164–74. PMID: [15817386](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/15817386/)
7. Pereira L, Pettit M, Fong A, Tsuge M, Tabata T, Fang-Hoover J, et al. Intrauterine Growth Restriction Caused by Underlying Congenital Cytomegalovirus Infection. *Journal of Infectious Diseases*. 2014; 209(10):1573–84. doi: [10.1093/infdis/jiu019](https://doi.org/10.1093/infdis/jiu019) PMID: [24403553](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/24403553/)
8. Rauwel B, Mariame B, Martin H, Nielsen R, Allart S, Pipy B, et al. Activation of peroxisome proliferator-activated receptor gamma by human cytomegalovirus for de novo replication impairs migration and invasiveness of cytotrophoblasts from early placentas. *J Virol*. 2010; 84(6):2946–54. PMID: [20042507](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/20042507/). doi: [10.1128/JVI.01779-09](https://doi.org/10.1128/JVI.01779-09)
9. Fournier T, Tsatsaris V, Handschuh K, Evain-Brion D. PPARs and the Placenta. *Placenta*. 2007; 28(2–3):65–76. PMID: [16834993](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/16834993/)
10. Pavan L, Tarrade A, Hermouet A, Delouis C, Titeux M, Vidaud M, et al. Human invasive trophoblasts transformed with simian virus 40 provide a new tool to study the role of PPAR γ in cell invasion process. *Carcinogenesis*. 2003; 24(8):1325–36. doi: [10.1093/carcin/bgg074](https://doi.org/10.1093/carcin/bgg074) PMID: [12807721](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/12807721/)
11. Le Faouder P, Baillif V, Spreadbury I, Motta J-P, Rousset P, Chêne G, et al. LC-MS/MS method for rapid and concomitant quantification of pro-inflammatory and pro-resolving polyunsaturated fatty acid metabolites. *Journal of Chromatography B*. 2013; 932(0):123–33.
12. Lopez H, Benard M, Saint-Aubert E, Baron M, Martin H, Al Saati T, et al. Novel model of placental tissue explants infected by cytomegalovirus reveals different permissiveness in early and term placentae and inhibition of indoleamine 2,3-dioxygenase activity. *Placenta*. 2011; 32(7):522–30. doi: [10.1016/j.placenta.2011.04.016](https://doi.org/10.1016/j.placenta.2011.04.016) PMID: [21605903](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/21605903/)
13. Six DA, Dennis EA. The expanding superfamily of phospholipase A2 enzymes: classification and characterization. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)—Molecular and Cell Biology of Lipids*. 2000; 1488(1–2):1–19.
14. Allal C, Buisson-Brenac C, Marion V, Claudel-Renard C, Faraut T, Dal Monte P, et al. Human Cytomegalovirus Carries a Cell-Derived Phospholipase A2 Required for Infectivity. *Journal of Virology*. 2004; 78(14):7717–26. doi: [10.1128/jvi.78.14.7717-7726.2004](https://doi.org/10.1128/jvi.78.14.7717-7726.2004) PMID: [15220446](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/15220446/)
15. Rak-Mardyla A, Karpeta A. Rosiglitazone stimulates peroxisome proliferator-activated receptor gamma expression and directly affects in vitro steroidogenesis in porcine ovarian follicles. *Theriogenology*. 2014; 82(1):1–9. doi: [10.1016/j.theriogenology.2014.02.016](https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2014.02.016) PMID: [24681211](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/24681211/)
16. Leesnitzer LM, Parks DJ, Bledsoe RK, Cobb JE, Collins JL, Consler TG, et al. Functional Consequences of Cysteine Modification in the Ligand Binding Sites of Peroxisome Proliferator Activated Receptors by GW9662. *Biochemistry*. 2002; 41(21):6640–50. PMID: [12022867](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/12022867/)

17. Schild RL, Schaiff WT, Carlson MG, Cronbach EJ, Nelson DM, Sadovsky Y. The Activity of PPAR γ in Primary Human Trophoblasts Is Enhanced by Oxidized Lipids. *Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*. 2002; 87(3):1105–10. doi: [10.1210/jc.87.3.1105](https://doi.org/10.1210/jc.87.3.1105)
18. Wittwer J, Hersberger M. The two faces of the 15-lipoxygenase in atherosclerosis. *Prostaglandins, Leukotrienes and Essential Fatty Acids*. 2007; 77(2):67–77.
19. Huang JT, Welch JS, Ricote M, Binder CJ, Willson TM, Kelly C, et al. Interleukin-4-dependent production of PPAR-[gamma] ligands in macrophages by 12/15-lipoxygenase. *Nature*. 1999; 400(6742):378–82. PMID: [10432118](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/10432118/)
20. Nagy L, Tontonoz P, Alvarez JGA, Chen H, Evans RM. Oxidized LDL Regulates Macrophage Gene Expression through Ligand Activation of PPAR β . *Cell*. 1998; 93(2):229–40. PMID: [9568715](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/9568715/)
21. Daynes RA, Jones DC. Emerging roles of PPARs in inflammation and immunity. *Nat Rev Immunol*. 2002; 2(10):748–59. PMID: [12360213](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/12360213/)
22. Wang Y, Zhu D, An Y, Sun J, Cai L, Zheng J. Preeclampsia activates 15-lipoxygenase and its metabolite 15-hydroxyeicosatetraenoic acid enhances constriction in umbilical arteries. *Prostaglandins, Leukotrienes and Essential Fatty Acids*. 2011; 86(1):79–84.
23. Johnson RD, Polakoski KL, Huang X, Sadovsky Y, Nelson DM. The release of 15-hydroxyeicosatetraenoic acid by human placental trophoblast is increased in preeclampsia. *American Journal of Obstetrics and Gynecology*. 1998; 178(1, Part 1):54–8. PMID: [9465803](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/9465803/)
24. Yuan D, Ran Y, Liu Q, Zhang Y, Li H, Li P, et al. Enhancement of the HIF-1 α and 15-LO/15-HETE Axis Promotes Hypoxia-Induced Endothelial Proliferation in Preeclamptic Pregnancy. *PLoS ONE*. 2014; 9(5):e96510. doi: [10.1371/journal.pone.0096510](https://doi.org/10.1371/journal.pone.0096510) PMID: [24796548](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/24796548/)
25. Wu M-Y, Yang R-S, Lin T-H, Tang C-H, Chiu Y-C, Liou H-C, et al. Enhancement of PLGF production by 15-(S)-HETE via PI3K-Akt, NF- κ B and COX-2 pathways in rheumatoid arthritis synovial fibroblast. *European Journal of Pharmacology*. 2013; 714(1):388–96. doi: [10.1016/j.ejphar.2013.07.010](https://doi.org/10.1016/j.ejphar.2013.07.010) PMID: [23872401](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/23872401/)
26. Torry DS, Ahn H, Barnes EL, Torry RJ. Placenta growth factor: potential role in pregnancy. *Am J Reprod Immunol*. 1999; 41(1):79–85. PMID: [10097790](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/10097790/).
27. Maidji E, Nigro G, Tabata T, McDonagh S, Nozawa N, Shiboski S, et al. Antibody Treatment Promotes Compensation for Human Cytomegalovirus-Induced Pathogenesis and a Hypoxia-Like Condition in Placentas with Congenital Infection. *The American Journal of Pathology*. 2010; 177(3):1298–310. doi: [10.2353/ajpath.2010.091210](https://doi.org/10.2353/ajpath.2010.091210) PMID: [20651234](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/20651234/)
28. Subbarayan V, Krieg P, Hsi LC, Kim J, Yang P, Sabichi AL, et al. 15-Lipoxygenase-2 gene regulation by its product 15-(S)-hydroxyeicosatetraenoic acid through a negative feedback mechanism that involves peroxisome proliferator-activated receptor [gamma]. *Oncogene*. 2006; 25(44):6015–25. PMID: [16682954](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/16682954/)
29. Majed BH, Khalil RA. Molecular Mechanisms Regulating the Vascular Prostacyclin Pathways and Their Adaptation during Pregnancy and in the Newborn. *Pharmacological Reviews*. 2012; 64(3):540–82. doi: [10.1124/pr.111.004770](https://doi.org/10.1124/pr.111.004770) PMID: [22679221](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/22679221/)
30. Fei J, Cook C, Santanam N. Omega-6 lipids regulate PPAR turnover via reciprocal switch between PGC-1 α and ubiquitination. *Atherosclerosis*. 2012; 222(2):395–401. PMID: [22464285](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/22464285/). doi: [10.1016/j.atherosclerosis.2012.02.040](https://doi.org/10.1016/j.atherosclerosis.2012.02.040)
31. Pavan L, Hermouet A, Tsatsaris V, Th ron P, Sawamura T, Evain-Brion DI, et al. Lipids from Oxidized Low-Density Lipoprotein Modulate Human Trophoblast Invasion: Involvement of Nuclear Liver X Receptors. *Endocrinology*. 2004; 145(10):4583–91. doi: [10.1210/en.2003-1747](https://doi.org/10.1210/en.2003-1747) PMID: [15242983](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/15242983/)
32. Winkler K, Wetzka B, Hoffmann MM, Friedrich I, Kinner M, Baumstark MW, et al. Low Density Lipoprotein (LDL) Subfractions during Pregnancy: Accumulation of Buoyant LDL with Advancing Gestation. *Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*. 2000; 85(12):4543–50. doi: [10.1210/jc.85.12.4543](https://doi.org/10.1210/jc.85.12.4543)
33. Pavan L, Tsatsaris V, Hermouet A, Therond P, Evain-Brion D, Fournier T. Oxidized Low-Density Lipoproteins Inhibit Trophoblastic Cell Invasion. *Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*. 2004; 89(4):1969–72. doi: [10.1210/jc.2003-032042](https://doi.org/10.1210/jc.2003-032042)
34. Coutant F, Agaue S, Perrin-Cocon L, Andre P, Lotteau V. Sensing Environmental Lipids by Dendritic Cell Modulates Its Function. *The Journal of Immunology*. 2004; 172(1):54–60. doi: [10.4049/jimmunol.172.1.54](https://doi.org/10.4049/jimmunol.172.1.54) PMID: [14688309](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/14688309/)
35. Gunthorpe MJ, Szallasi A. Peripheral TRPV1 receptors as targets for drug development: new molecules and mechanisms. *Curr Pharm Des*. 2008; 14(1):32–41. PMID: [18220816](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/18220816/).
36. Toth A, Boczan J, Kedei N, Lizanecz E, Bagi Z, Papp Z, et al. Expression and distribution of vanilloid receptor 1 (TRPV1) in the adult rat brain. *Molecular Brain Research*. 2005; 135(1–2):162–8. PMID: [15857679](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/15857679/)

37. Alsalem M, Wong A, Millns P, Arya PH, Chan MSL, Bennett A, et al. The contribution of the endogenous TRPV1 ligands 9-HODE and 13-HODE to nociceptive processing and their role in peripheral inflammatory pain mechanisms. *British Journal of Pharmacology*. 2013; 168(8):1961–74. doi: [10.1111/bph.12092](https://doi.org/10.1111/bph.12092) PMID: [23278358](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/23278358/)
38. Holdsworth-Carson SJ, Lim R, Mitton A, Whitehead C, Rice GE, Permezel M, et al. Peroxisome proliferator-activated receptors are altered in pathologies of the human placenta: Gestational diabetes mellitus, intrauterine growth restriction and preeclampsia. *Placenta*. 2010; 31(3):222–9. doi: [10.1016/j.placenta.2009.12.009](https://doi.org/10.1016/j.placenta.2009.12.009) PMID: [20045185](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/20045185/)
39. Staff AC, Dechend R, Pijnenborg R. Learning From the Placenta: Acute Atherosclerosis and Vascular Remodeling in Preeclampsia—Novel Aspects for Atherosclerosis and Future Cardiovascular Health. *Hypertension*. 2010; 56(6):1026–34. doi: [10.1161/hypertensionaha.110.157743](https://doi.org/10.1161/hypertensionaha.110.157743) PMID: [20956732](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/20956732/)

TITLE :

PHYSIOPATHOLOGY OF CYTOMEGALOVIRUS INFECTION OF HUMAN NEURAL PROGENITOR CELLS

Abstract :

Congenital infection by human cytomegalovirus (HCMV) is a leading cause of permanent sequelae of the central nervous system, including sensorineural deafness, cerebral palsies or devastating neurodevelopmental abnormalities (0.1 % of all births). To gain insight on the impact of HCMV on neuronal development, we used both neural stem cells from human embryonic stem cells (NSC) and brain sections from infected fetuses. We investigated the outcome of infection on Peroxisome Proliferator-Activated Receptor gamma (PPAR γ), a transcription factor critical in the developing brain. We observed that HCMV infection dramatically impaired the rate of neuronogenesis and strongly increased PPAR γ levels and activity. Consistent with these findings, levels of 9-hydroxyoctadecadienoic acid (9-HODE), a known PPAR γ agonist, were significantly increased in infected NSCs. Likewise, exposure of uninfected NSCs to 9-HODE recapitulated the effect of infection on PPAR γ activity. It also increased the rate of cells expressing the IE antigen in HCMV-infected NSCs. Further, we demonstrated that (1) pharmacological activation of ectopically expressed PPAR γ was sufficient to induce impaired neuronogenesis of uninfected NSCs, (2) treatment of uninfected NSCs with 9-HODE impaired NSC differentiation and (3) treatment of HCMV infected NSCs with the PPAR γ inhibitor T0070907 restored a normal rate of differentiation. The role of PPAR γ in the disease phenotype was strongly supported by the immunodetection of nuclear PPAR γ in brain germinative zones of congenitally infected fetuses (N=20), but not in control samples. We also identified LIS1 as one of the target genes for PPAR γ in the infected brain. Levels of LIS1, the gene of classical lissencephaly, were strongly increased in infected NSC, presumably resulting from increased PPAR γ activity. The relevance of this finding was further supported by our demonstration of a massive increase in the immunodetection in LIS1 fetal brains congenitally infected with HCMV (N = 6), relative to control cases (N = 3). Indeed, it is well known that overexpression of LIS1 is responsible for significant abnormalities of neural migration and development of a lissencephaly-like phenotype.

Altogether, our findings reveal a key role for PPAR γ in neurogenesis and in the pathophysiology of HCMV congenital infection. They also pave the way to the identification of PPAR γ gene targets in the infected brain.

AUTEUR : Maude ROLLAND

TITRE : Physiopathologie de l'infection par le cytomégalo­virus sur les progéniteurs neurax humains

**DIRECTEUR DE THESE : Docteur Stéphane Chavanas, Docteur Christian Davrinche,
Docteur Daniel Duniaž**

LIEU ET DATE DE SOUTENANCE : 5 décembre 2016, Toulouse

RESUME :

L'infection congénitale par le cytomégalo­virus humain (HCMV) est la première cause de séquelles acquises du système nerveux central (CNS). Elle est responsable de surdités neurosensorielles, de paralysies cérébrales ou d'anomalies neuro-développementales graves (0,1% des naissances) telles que des microcéphalies ou des anomalies de gyration. Pour étudier les effets de l'infection par le HCMV sur le développement cérébral, nous utilisons des cellules souches neurales (NSC) humaines dérivées de cellules souches embryonnaires (ES), ainsi que des coupes histologiques de cerveaux fœtaux infectés. Notre travail a porté sur l'analyse des conséquences de l'infection sur un facteur de transcription essentiel lors du développement cérébral, le Peroxisome Proliferator-Activated Receptor gamma (PPAR γ). Nous avons démontré que l'infection par le HCMV diminuait la neuronogénèse, en association avec une augmentation des niveaux d'expression et d'activité de PPAR γ . En accord avec ces résultats, nous avons montré que le niveau d'expression de l'acide 9-hydroxyoctadécadiénoïque (9-HODE), un agoniste connu de PPAR γ , était augmenté dans les NSC infectées. En outre, l'ajout de 9-HODE dans les NSC reproduit l'effet de l'infection sur PPAR γ , conduisant à une augmentation du nombre de cellules positives pour l'antigène viral IE parmi les NSC infectées. De plus, nous avons démontré que : (1) l'activation pharmacologique ou l'expression ectopique de PPAR γ suffisent pour perturber la neuronogénèse de NSC non infectées ; (2) le traitement de NSC non infectées par le 9-HODE diminue la différenciation des NSC ; (3) le traitement de NSC infectées par du T0070907, un inhibiteur de PPAR γ , restaure un taux normal de différenciation. Le rôle crucial de PPAR γ dans les pathologies fœtales liées à l'infection a été souligné par la mise en évidence de sa translocation nucléaire au sein des zones germinatives de cerveaux fœtaux infectés congénitalement par le HCMV (N=20), mais pas dans les cas contrôles. Nous avons également identifié un des gènes cibles de PPAR γ dans le cerveau infecté: LIS1, le gène de la lissencéphalie classique, dont l'expression est également augmentée dans les NSC infectées, de façon dépendante de l'activité de PPAR γ . Nous avons mis en évidence que l'expression de LIS1 était augmentée de façon massive dans les cerveaux fœtaux infectés congénitalement par le HCMV (N=6) par rapport aux cas contrôles (N=3). Ceci pourrait jouer un rôle central dans la physiopathologie, car il est connu que toute perturbation de l'expression de LIS1 conduit à des anomalies importantes de la migration neurale et au développement d'un phénotype dit "lissencephaly-like". L'ensemble de nos données révèle le rôle clé de PPAR γ dans la neuronogénèse et la pathophysiologie de l'infection congénitale par le HCMV. Elles ouvrent la voie à une meilleure compréhension des mécanismes régissant les phénotypes pathologiques, notamment concernant le rôle de LIS1 dans les anomalies de la migration neurale.

MOTS-CLES

Cytomégalo­virus, cellules souches neurales humaines, PPAR γ , LIS1

DISCIPLINE ADMINISTRATIVE : Physiopathologie - Virologie

INSERM UMR1043, Centre de Physiopathologie de Toulouse Purpan

Equipe : Pathogénie des infections virales du système nerveux central adulte et en développement

CHU Purpan – BP 3028

31024 Toulouse Cedex 3, France