

Université Paris Descartes

Ecole doctorale BioSPC

Laboratoire de virologie

Déterminants immuno-virologiques de l'infection congénitale à cytomégalovirus dans les prélèvements foetaux périphériques et dans le tissu cérébral

Par Yann SELLIER

Thèse de doctorat de virologie

Dirigée par Dr Marianne LERUEZ-VILLE

Présentée et soutenue publiquement le 06 octobre 2016

JURY :

ALAIN Sophie, rapporteur,	Professeur des Universités
MARCHANT Arnaud, rapporteur,	Professeur des Universités, Directeur de recherche
VILLE Yves,	Professeur des Universités
CANDON Sophie,	Maître de conférences des Universitaires
CHAVANAS Stéphane,	Chargé de Recherche

Université Paris Descartes

Ecole doctorale BioSPC

Laboratoire de virologie

Déterminants immuno-virologiques de l'infection
congénitale à cytomégalo virus dans les
prélèvements foetaux périphériques et dans le tissu
cérébral

Par Yann SELLIER

Thèse de doctorat de virologie

Dirigée par Dr Marianne LERUEZ-VILLE

Présentée et soutenue publiquement le 06 octobre 2016

JURY :

ALAIN Sophie, rapporteur,	Professeur des Universités
MARCHANT Arnaud, rapporteur,	Professeur des Universités, Directeur de recherche
VILLE Yves,	Professeur des Universités
CANDON Sophie,	Maître de conférences des Universitaires
CHAVANAS Stéphane,	Chargé de Recherche

Remerciements

Au Dr Marianne Leruez-Ville pour m'avoir ouvert les portes de la recherche en biologie et guidé tout au long de cette thèse. Merci pour votre gentillesse, votre bonne humeur et vos conseils précieux. Votre passion pour la recherche est communicative. J'espère pouvoir, d'une façon ou d'une autre, travailler encore longtemps sur le CMV à Necker. C'est avec beaucoup d'estime et un profond respect que je vous remercie pour ces 4 années sous votre direction.

Aux Pr Ville, Pr Alain, Pr Marchant, Dr Candon, Dr Chavanas de m'avoir fait l'honneur d'accepter d'être membre du jury de cette thèse.

Au Pr Franck Pages pour ses précieux conseils et sa disponibilité ainsi que toute l'équipe 15 de l'HEGP et notamment Nacilla Haicheur et Florence Marliot pour leur aide précieuse et leur patience.

A Corinne Cordier et Jérôme Mégret pour m'avoir accueilli au centre de tri cellulaire et avoir partagé des expériences enrichissantes ensemble.

Au Dr Bettina Bessières pour le partage de connaissances et l'écoute apportée durant tout ce temps.

Aux Dr Maryse Bonnière et Dr Ferechte Razavi pour leurs gentillesse, conseils et disponibilités.

A Leila Hakkakian pour sa précieuse écoute et son empathie. Merci à toute l'équipe de fœtopathologie.

A Tiffany Guillemot de m'avoir transmis son savoir, sa pratique des techniques de laboratoire, mais aussi merci d'avoir toujours été là, de m'avoir supporté durant toutes ces années. Merci pour ton amitié.

Je tiens également à remercier toute l'équipe de virologie pour sa disponibilité, jovialité, écoute et empathie.

Au Département de la Recherche Clinique et du Développement (à l'AH-HP) pour la création de la bourse doctorale sage-femme dont j'en suis bénéficiaire.

Je réitère mes remerciements :

Au Dr Sophie Candon pour tous ses précieux conseils donnés et sa disponibilité durant ces 4 années de thèse.

Au Dr Stéphane Chavanas pour m'avoir accueilli à Toulouse et m'avoir fait participer aux projets de recherche. Merci également à toute l'équipe de Toulouse pour son merveilleux accueil.

C'est également avec un profond respect et admiration que je tiens à remercier le Pr Ville. Merci de m'avoir ouvert les portes de la maternité, de la recherche mais également merci d'avoir initié en moi le goût de l'art. « L'art véritable n'est pas seulement l'expression d'un sentiment, mais aussi le résultat d'une vive intelligence » souligne Hendrik Petrus Berlage.

Je tiens également à remercier Sophie Guillaume à qui je dois beaucoup. Toujours présente, à l'écoute et toujours de bon conseil... Merci aussi de m'avoir donné l'opportunité de travailler ma thèse tout en continuant les gardes à la maternité.

Je remercie également l'ensemble de l'équipe de la maternité, pour son soutien, son aide précieuse.

Merci à Michèle Rivière, d'avoir été là, de m'avoir conseillé, guidé et accompagné durant ces 4 années.

A mon co-doctorant, Antoine Millet, merci pour ta bonne humeur, ta gentillesse et surtout merci pour ton expertise en graphisme.

A Andreas, merci pour cette belle amitié qui a commencé dès le premier jour de thèse et qui continuera bien après la fin.

A Helmi, pour m'avoir supporté ces 4 années, d'avoir toujours été présent, dans les périodes de joies comme dans les périodes les plus difficiles. Merci pour ton soutien qui m'a tant aidé.

A la fine équipe : Arnaud, Aurélie, Camille, Brita, Selin, Kinan, Siham pour votre présence, votre jovialité, votre amitié sans condition. J'ai beaucoup de chance.

A mes amis parisiens, ils se reconnaîtront,

Merci également aux membres du collège des sages-femmes de France pour leur amitié, leur soutien, leur compréhension et leur gentillesse.

A toute personne qui m'a soutenu et aidé à progresser sur un plan professionnel comme personnel.

A ma famille,

A mes parents et grands-parents, toujours présents, toujours disponibles. Merci pour votre amour indéfectible. Merci de m'avoir guidé et accompagné depuis plus de 30 ans.

A mon frère et à ma belle-sœur sans oublier ma petite Eva.

Déterminants immuno-virologiques de l'infection congénitale à cytomégalo­virus dans les prélèvements fœtaux périphériques et dans le tissu cérébral

Résumé : Avec une prévalence mondiale de 0,7%, l'infection *in utero* à cytomégalo­virus (CMV) représente la première cause de handicap neurologique congénital d'origine infectieuse. Les modalités de prise en charge de cette infection restent débattues notamment en raison de l'absence de marqueurs pronostics fiables et d'inconnus sur sa physiopathologie notamment celle de l'atteinte du cerveau fœtal. Le premier objectif de notre travail était de décrire et valider des marqueurs immuno-virologiques prédictifs de la transmission verticale et de séquelles néonatales. Le deuxième objectif était d'étudier les corrélats immuno-virologiques *in situ* de la sévérité de l'atteinte du cerveau fœtal. Nous avons pu établir à partir du bilan virologique maternel (avidité des IgG et ADN CMV sanguin) un score de risque de transmission verticale du virus en cas de primo-infection maternelle. Nous avons montré que le niveau du réservoir viral fœtal, reflété par la charge virale dans le liquide amniotique et dans le sang fœtal, était un marqueur prédictif des séquelles néonatales. Ainsi, la combinaison de la mesure du réservoir viral fœtal avec l'imagerie fœtale a permis d'établir des scores pronostics avec des valeurs prédictives positives et négatives de 80 à 100% respectivement. Nous avons mis en évidence par immuno-histo­chimie couplée à une analyse quantitative d'images que la multiplication virale ainsi que la réponse immunitaire innée (cellules NK) et adaptative (CD8+ et plasmocytes) étaient significativement plus élevées dans les cerveaux fœtaux les plus sévèrement atteints. Ce résultat paradoxal nous a incité à quantifier la présence du marqueur PD-1 et celle de son récepteur PD-L1. PD-1 était significativement plus exprimé dans les cerveaux sévèrement atteints. L'analyse par cytométrie de flux montrait que PD-1 était exprimé par 96% des CD8+ mais aussi par plus de 70% des lymphocytes B et des cellules NK. Ces résultats témoignent de l'existence dans les cerveaux fœtaux infectés d'un épuisement immunitaire touchant la réponse adaptative mais aussi innée. Enfin, l'analyse par cytométrie de flux montrait la présence d'une réplication virale dans les différents types de cellules neuronales (cellules souches, neurones, astrocytes). En conclusion, les résultats de notre travail ont permis d'améliorer les algorithmes de prise en charge de l'infection à CMV *in utero* grâce à la validation de marqueurs prédictifs immuno-virologiques. Par ailleurs, le fait qu'un épuisement immunitaire et une forte multiplication virale soient associés à la sévérité de l'atteinte cérébrale est important pour l'élaboration de stratégies thérapeutiques *in utero*.

Immuno-virologic determinants of congenital cytomegalovirus infection in peripheral fetal samples and brain tissue

Abstract: CMV congenital infection has a worldwide incidence estimated at about 0.7% of all life births and represents the major cause of neurological handicap of infectious origin. The management of this infection remains highly debated. Several factors contribute to this and among them are the absence of recognized prognostic markers and gaps in the knowledge of its pathogenicity particularly that of the fetal brain. The first objective of this work was to describe and validate immune and virological predictive markers of vertical transmission and of neonatal sequelae. The second objective was to study *in situ* immune and virological correlates of the severity of fetal brain infection. We first validated a model of materno-fetal transmission based on maternal virological results (IgG avidity and blood CMV DNA). We then showed that the viral reservoir level, estimated by the viral load in the amniotic fluid and the fetal blood, was a predictive marker of neonatal sequelae. Prognosis models combining quantification of the viral reservoir to fetal imaging allow to reach positive and negative predictive values up to 80% and 100% respectively. We showed using immunohistochemistry and quantitative image analysis that viral multiplication as well as both innate immune responses (NK cells) and adaptive immune responses (CD8+ and plasma cells) were significantly higher in the most severely infected fetal brains. This paradox drove us to quantify PD-1 and its receptor PD-L1, PD-1 expression was significantly higher in severely affected fetal brains. Cytometry flow analysis evidenced that PD-1 was expressed in 95% of CD8+ cells but also in at least 70% of NK cells and of B cells. These results demonstrate immune exhaustion of both adaptive and innate responses in fetal infected brains. Finally, viral replication was evidenced in stem cells, neurons and mature astrocytes after separation by flow cytometry of these neuronal cell types. In conclusion, the validation of immune-virological markers obtained within this work has usefully improved the algorithms for the clinical management of *in utero* CMV infection. Moreover, the demonstration that immune exhaustion and high viral multiplication are responsible of severe fetal brain affection is important to elaborate *in utero* treatment strategies.

Mots clés : Cytomégalo­virus, infection congénitale, fœtus, cerveau, réponse immunitaire, valeurs pronostiques

Keywords : Cytomegalovirus, congenital infection, fetus, brain, immune response, prognosis values

Liste des abréviations

AA : Acide Aminé

ADN : Acide Désoxyribonucléique

ARN : Acide Ribonucléique

ARNm : Acide Ribonucléique messenger

CD : Cluster de Différenciation

CMV : Cytomégalovirus

CMH : Complexe Majeur Histocompatibilité

CSHPF : Conseil Supérieur d'Hygiène Publique de France

DAB : Diaminobenzidine

DC-SIGN : Dendritic Cell-Specific Intercellular (adhesion molecule) Grabbing Non-integrin

dNK : Decidual Natural Killer

E : Early

ECP : Effet Cytopathique

EGF-R : Epidermal Growth Factor Receptor

ELISA : Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay

GFAP : Glial Fibrillary Acidic Protein

gpCMV : guinea pig cytomegalovirus

HAS : Haute Autorité de Santé

HCMV : Human cytomegalovirus

HLA : Human Leukocyte Antigen

HODE : Hydroxyoctadecadienoic acid

IE : Immediate Early

IFN : Interféron

Ig : Immunoglobuline

IL : Interleukine

IMG : Interruption médicale de grossesse

IRL : Internal repeat long

IRM : Imagerie par Résonance Magnétique

IRS : Internal repeat short

KIR : Killer Immunoglobulin like Receptors

Kpb : Kilo paire de bases

L : Late

LA : Liquide amniotique

mCBP : Minor Capsid Binding Protein

MCMV : Murin cytomegalovirus

MCP : Major Capsid Protein

MIEP : Major Immediate Early Promotor

MIP-1 β : Macrophage inflammatory protein

moDC : Monocyte derived dendritic cells

MOI : Multiplicity of Infection

MoM : Multiple de la médiane

NCR : Natural Cytotoxicity Receptors

NF-kB : Nuclear Factor kappa B

NG2 : N-Glycan 2

NHA : Normal Human Astrocyte

NK : Natural Killer

NO : Oxyde Nitrique

NSC : Neural Stem Cell

OMS : Organisation Mondiale de la Santé

PCR : Polymerase Chain Reaction

PD-1 : Programmed cell Death 1

PDGFR : Platelet-Derived Growth Factor Receptors

PD-L1 : Programmed cell Death Ligand 1

PPAR γ : Peroxisome Proliferator-Activated Receptor *Gamma*

PPRE : PPAR Response Element

RCUI : Retard de Croissance Intra-Utérin

RXR : Retinoid X Receptor

SA : Semaine d'Aménorrhée

SCP: Smallest Capsid Protein

SMA : Alpha-Smooth Muscle

SNC : Système Nerveux Central

TLR : Toll-like receptor

TNF : Tumor Necrosis Factor

TRL : Terminal Repeat Long

TRS : Terminal Repeat Short

UL : Unique Long

US : Unique Short

UI : Unité Internationale

Ve-cadherin : Vascular endothelial cadherin

VHC : Virus de l'Hépatite C

VEGF : Vascular Endothelial Growth Factor

VIH : Virus de l'Immunodéficience Humaine

Table des matières

PARTIE 1 : INTRODUCTION

I.	Le cytomegalovirus, généralités	10
1.	Historique	10
2.	Classification	10
3.	Description du virus	11
a.	Le génome viral	12
b.	La nucléocapside	12
c.	Le tégment	12
d.	L'enveloppe virale	13
4.	Tropisme du virus	14
5.	Cycle de réplication du virus	14
a.	Ancrage et pénétration du virus dans la cellule hôte	14
b.	Transcription et réplication	15
c.	Latence et réactivité	17
II.	Infection materno-fœtale à cytomegalovirus	17
1.	Epidémiologie de l'infection materno-fœtale à CMV	17
2.	Manifestations cliniques	20
a.	De l'infection maternelle	20
b.	De l'infection fœtale	20
c.	De l'infection du nouveau-né	20
3.	Diagnostic virologique	21
a.	De l'infection maternelle	21
b.	De l'infection fœtale	24
c.	De l'infection du nouveau-né	25
4.	Diagnostic rétrospectif de l'infection congénitale à CMV	25
5.	Bilan pronostic de l'infection fœtale	26
6.	Prise en charge de l'infection materno-fœtale/ congénitale à CMV	28
7.	Traitements	29
a.	Le traitement préventif de la transmission au fœtus par les immunoglobulines hyper-immunes	30
b.	Le traitement antiviral pour les fœtus infectés	30
c.	Le traitement néonatal par le ganciclovir/ valganciclovir	30
III.	Immunité et CMV	31
1.	La réponse immunitaire innée	31
2.	La réponse immunitaire adaptative cellulaire et humorale	34
3.	Les cytokines et chimiokines	37
IV.	Le cerveau fœtal	37
1.	Le neuro-développement	37
2.	Les marqueurs des cellules du cerveau humain	40
3.	Infection à CMV et anomalie cérébrales	42
4.	Tropisme du CMV pour les cellules du cerveau	42
5.	Réaction immunitaire dans le cerveau	43

a.	La réponse immunitaire innée.....	43
b.	La réponse immunitaire adaptative.....	44
c.	Les cytokines dans le cerveau.....	45
V.	Rôle du PPARγ	47
1.	Généralités.....	47
2.	PPAR γ dans le placenta.....	49
3.	PPAR γ dans le cerveau	51
PARTIE 2 : TRAVAUX DE RECHERCHE		
	OBJECTIFS	52
	Article 1	54
	Article 2.....	56
	Article 3.....	58
	Article 4.....	60
	Article 5.....	62
PARTIE 3 : DISCUSSION ET PERSPECTIVES		
	CONCLUSION	120
	ANNEXES	121
	REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES	123

I. Le cytomégalovirus, généralités

1. Historique

La première description du cytomégalovirus (CMV) est publiée en 1904 par Ribbert et al (1) qui observent de grandes cellules à inclusion dans le rein de fœtus mort-nés. Jeionek et Kiolemenoglou décrivent également de grandes cellules dans le foie et les poumons de fœtus et d'enfants mort-nés, ils nommeront cette maladie « la maladie des cellules à inclusion ». En 1925, Pappenheimer et Von Glahn (1) notent que ces inclusions sont retrouvées sur des patients atteints d'herpès et rattachent ainsi la présence d'inclusions à un groupe de virus dénommé *Herpesviridae*. En 1932, Farber publie une étude démontrant qu'environ ¼ des enfants décédés de pathologies sans point commun apparent, présentent des inclusions cytomégaliennes dans leurs glandes salivaires, il parle alors de « virus des glandes salivaires ». La première technique de diagnostic de l'infection à CMV est réalisée dans les urines de nouveau-nés dans les années 50 par Wyatt. Smith (2), obtiendra en 1956 la réplique du virus dans des cellules fibroblastiques humaines cultivées *in vitro*. Par la suite Rowe (3), isole la première souche à partir du tissu adénoïdien d'un enfant asymptomatique. Cette souche s'appellera AD169. En 1960 Weller (1) désigne ce virus « cytomégalovirus » en raison de la morphologie des cellules infectées. En 1961, Blanc décrit une nécrose villositaire avec des inclusions cytomégaliennes dans le placenta d'un fœtus mort-né à 25 semaines de grossesse (4).

2. Classification

Le cytomégalovirus appartient à la famille des *Herpesviridae* qui comprend 8 virus infectant l'homme répartis en 3 sous familles (β, α, γ). Le CMV humain ou HCMV, est classé dans la sous famille *β herpesvirinae*. *Figure 1*

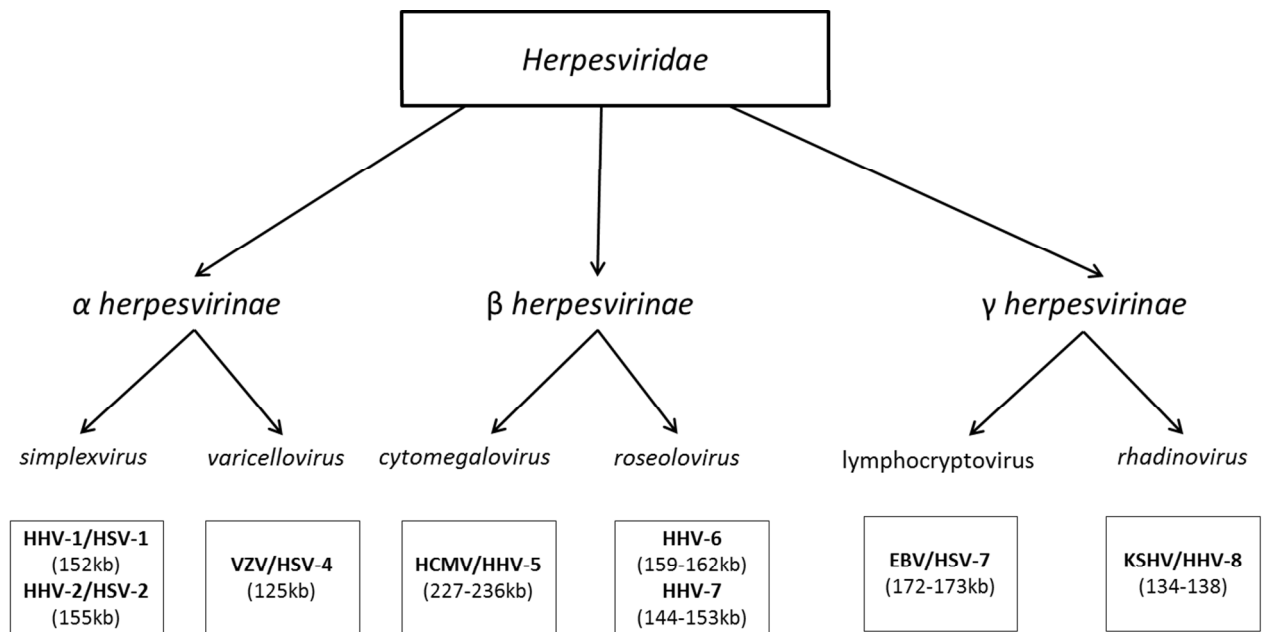


Figure 1 : Classification des herpesvirus humains, d'après Crougth, 2009. (5)
 HHV : Humain Herpès Virus, HSV : Herpès Simplex Virus, VZV : Varicelle Zona Virus,
 HCMV : Human Cytomegalovirus, EBV : Epstein-Barr Virus, KSHV : Kaposi Sarcoma
 Herpesvirus

Les *Herpesviridae* partagent des propriétés communes telles que la structure du virion et la capacité soit d'établir une infection latente qui correspond au contrôle de la réplication du virus, soit d'établir une infection lytique qui correspond à une forte réplication virale (ex : immunodéficiency). Le CMV a également des propriétés communes et spécifiques à la sous famille des β herpesvirus telles qu'un tropisme pour les glandes salivaires, une croissance lente en culture cellulaire fibroblastique et aussi une stricte spécificité d'espèce. En effet, le HCMV ne peut se répliquer que dans les cellules humaines (1).

3. Description du virus

Le génome du CMV est un Acide Désoxyribonucléique (ADN) double brin, linéaire. Cet ADN est entouré d'une nucléocapside icosaédrique, elle-même entourée du tégument. Le tout est recouvert d'une enveloppe (d'origine cellulaire) composée de nombreuses glycoprotéines virales. L'ensemble compose le virion (6). *Figure 2*

a. Le génome viral

Le génome du CMV est le plus grand de ceux de la famille des *Herpesviridae* avec environ 240 kpb (de 229 à 354 kpb en fonction des souches) (5).

Il est composé :

D'un segment unique long (UL) correspondant à 82% du génome et d'un segment unique court (US). Chacun de ces segments contient des séquences répétées terminales TRL (Terminal Repeat long) et TRS (Terminal Repeat short) et des séquences répétées internes IRL (Internal Repeat Long) pour UL et IRS (Internal Repeat Short) pour US. *Figure 2*

Le génome du CMV présente une grande variabilité pour un virus à ADN, avec une différence nucléotidique de 4,7% entre 2 souches (la plus élevée des *Herpesviridae*) (7). Cette variabilité génétique n'est pas *a priori* liée à des erreurs de réplication puisque l'ADN polymérase virale a une activité correctrice. Mais il y aurait une pression génétique positive notamment sur les gènes modulant la réponse immunitaire. Par ailleurs, il existe de nombreuses recombinaisons entre souches. En effet, en raison de l'immuno-évasion, les infections multiples d'un même individu et les recombinaisons entre souches sont fréquentes.

b. La nucléocapside

La capsid du CMV est de type icosaédrique et comporte 163 capsomères. Elle est composée essentiellement de la protéine MCP (Major Capsid Protein) codée par le gène UL86 mais également de la protéine mCBP (minor Capsid Binding Protein) codée par le gène UL46 et localisée sur la face interne de la capsid, ainsi que la protéine SCP (Smallest Capsid Protein) (8).

c. Le tégment

Le tégment est situé entre la nucléocapsid et l'enveloppe virale. Il est composé de protéines phosphorylées d'origines virale et cellulaire. Il représente 40% de la masse du virion. La protéine pp65 constitue environ 95% du tégment et est codée par le gène UL83. Elle semble jouer un rôle important dans la régulation des gènes viraux et dans le contrôle du métabolisme cellulaire lors de la réplication virale. La protéine pp150 codée par le gène UL32, représente 20% de la masse du virion et semble jouer un rôle semblable à celle de la pp65 (9). D'autres protéines du tégment jouent un rôle dans la réplication, telle que la pp71 (codée par le gène UL82) qui est un trans-activateur de l'expression des gènes viraux. La pp28

(phosphoprotéine) codée par l'UL99 joue un rôle dans la régulation de l'expression de gènes viraux. Cette protéine est en contact avec l'enveloppe et permet la formation de virions enveloppés à partir des capsides tégmentées. Bien d'autres protéines sont retrouvées dans cette matrice, mais la fonction de la plupart de ces protéines reste indéterminée (10–12).

En plus de ces protéines, le tégment contient également des Acides Ribonucléiques (ARN) cellulaires et viraux (13). Ceux-ci permettent à certains gènes viraux d'être exprimés directement après l'entrée du virus dans la cellule.

d. L'enveloppe virale

L'enveloppe virale est constituée d'une bi-couche phospholipidique résultant du bourgeonnement du virion au niveau de l'appareil de Golgi et du réticulum endoplasmique. Elle possède à sa surface un grand nombre de glycoprotéines virales dont les plus importantes sont la gB, gH, gL, gO, gM et gN. La plupart de ces protéines joue un rôle dans la pénétration du virus dans la cellule et dans la transmission du virus (14,15).

La gB, codée par UL55, est une glycoprotéine transmembranaire essentielle à l'interaction des résidus héparan-sulfates lors de la phase d'adhésion et d'entrée du virus (16,17). Elle est particulièrement immunogène et constitue la cible majeure des anticorps neutralisants (18).

Le complexe gH/gL est commun à la famille des *Herpesviridae* et participe au transport intracellulaire (19). La gL chaperonne la gH qui elle-même assure les fonctions de fusion entre les enveloppes virales et cellulaires (20,21). Lorsque ce complexe est absent, le virion peut quand même rentrer dans la cellule mais ne peut pas exprimer les gènes Immediate Early (IE) nécessaires au déroulement du cycle viral (22).

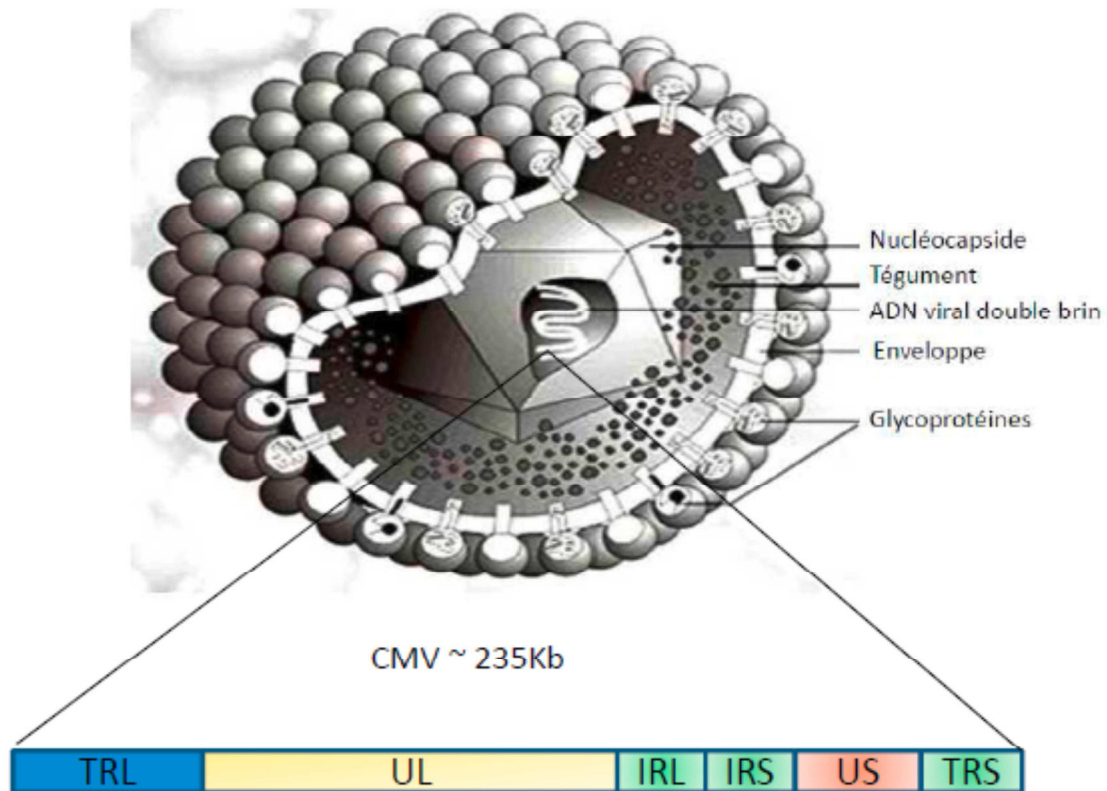


Figure 2 : Structure du cytomégalovirus ainsi que les différents segments du génome viral. TRL: Terminal Repeat Long; UL: Unique Long; IRL: Internal Repeat Long; IRS: Internal Repeat Short; US: Unique Short; TRS: Terminal Repeat Short. D'après Tomtishen III.JP, 2012 et Crough, 2009 (5,9).

4. Tropisme du virus

Le HCMV est spécifique d'espèce et ne peut pas infecter les animaux ou se répliquer dans des lignées de cellules animales. Le HCMV a donc un spectre d'hôtes très restrictif en culture cellulaire. Les fibroblastes de peau ou de poumons sont les cellules les plus permissives *in vitro*. *In vivo*, le virus se multiplie dans de nombreux types cellulaires : fibroblastes, cellules épithéliales, macrophages, cellules musculaires lisses et cellules endothéliales (23–26).

5. Cycle de réplication du virus

a. Ancre et pénétration du virus dans la cellule hôte

Le mécanisme d'entrée du HCMV est actuellement mal connu et il est variable en fonction du type cellulaire (27). L'attachement et la pénétration à la surface cellulaire sont rapides et efficaces dans les cellules permissives et non permissives ce qui suggère que les récepteurs au

CMV sont largement distribués. La phase d'attachement du virus à la cellule fait intervenir les résidus d'héparans-sulfate cellulaires qui interagissent avec le complexe gM/gN et la gB (28,29). Le virus s'attache ensuite aux récepteurs et co-récepteurs cellulaires (30). Certains récepteurs sont identifiés tels que les protéoglycanes héparans-sulfate, les intégrines β -1 et 2, DC-sign, PDGF-R (Platelet Derived Growth Factor) et l'EGF-R (Endothelial Growth Factor receptor) (31–33). Parmi les co-récepteurs ont été décrits la β -2 microglobuline, l'annexine et l'US28 (34).

Deux modèles de pénétration cellulaire sont décrits: 1) dans les fibroblastes, il y a fixation du dimère gH/gL associé à la protéine gO sur leur récepteur cellulaire, cette fixation serait suivie d'un changement de conformation de la gB puis d'une fusion avec la membrane plasmique et d'une pénétration cellulaire 2) la pénétration dans les cellules endothéliales, épithéliales, dendritiques et monocytaires nécessiterait la fixation du pentamère viral constitué du dimère gH/gL associé aux protéines UL128/UL130/UL131 sur son récepteur cellulaire et impliquerait un phénomène de macropinocytose et de fusion avec les endosomes (35). Dès la fusion, les protéines de capsides sont dégradées et l'ADN viral migre vers le noyau de la cellule hôte pour débiter la réplication virale (36).

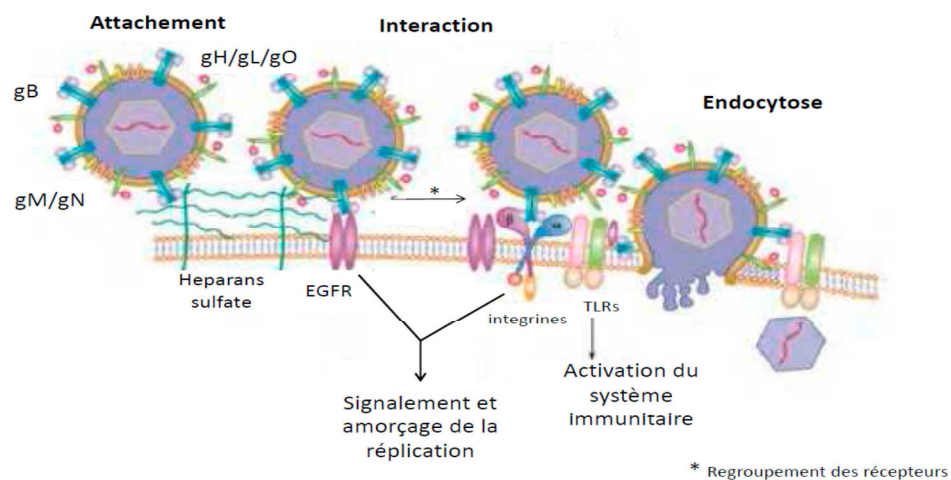


Figure 3 : Mécanisme d'entrée du CMV dans les cellules, d'après Compton, 2004 (30).

b. Transcription et réplication

Le cycle du HCMV varie de 96 à 120 heures, alors que le cycle de réplication des autres membres de la famille des *Herpesviridae* dure 8h (37,38). La culture d'une souche clinique dans des fibroblastes embryonnaires humains entraîne un effet cytopathique (ECP) spécifique

avec un élargissement et une ballonnisation des cellules visible au bout de 10 à 15 jours. Si la souche sauvage ne libère que peu de virions dans les cultures, les souches de laboratoires AD169 et Towne provoquent un ECP en 7-10 jours et libèrent rapidement et massivement des virions. La nucléocapside du HCMV, une fois entrée dans la cellule, migre rapidement vers le noyau. La protéine pp65 (protéine du tégument du virus) est détectée environ 30 minutes après l'exposition au CMV. Les gènes IE1 et IE2 s'expriment rapidement après l'entrée du virion, suivis par l'expression des gènes early (E) et des gènes late (L), plus tardive (39).

La transcription des gènes s'effectue ainsi en 3 phases :

✓ Phase très précoce (IE)

La phase IE correspond à la transcription d'ARNm très précoces conduisant à la traduction de protéines régulatrices de la transcription virale. Ces protéines très précoces, l'IE1 (573 AA) et IE 2 (491AA) sont des phosphoprotéines nucléaires sous le contrôle du promoteur majeur « MIEP » (Major Immediate Early Promotor) qui comprend de nombreux sites de fixation à des facteurs de transcription (40–42).

✓ Phase précoce (E)

Cette phase correspond à la phase de la réplication virale. Le génome se circularise et la protéine UL84 initie la réplication en entraînant le déroulement de l'ADN (43). La polymérase virale (codée par le gène UL54) déclenche la synthèse de l'ADN.

Cette phase correspond également à la synthèse de protéines du tégument telle que la pp65 (codé par le gène UL83) mais également à la production de protéines correspondant à des enzymes de la réplication virale tels que l'ADN polymérase virale et son co-facteur (codés respectivement par les gènes UL54 et UL44), la protéine kinase (UL97) ainsi que d'autres protéines souvent conservées dans la famille des *Herpesviridae* (44–46).

✓ Phase tardive (L)

Cette phase précède la libération des virions. Le génome viral est dupliqué. Les protéines structurales telles que les protéines (majeures et mineures) de la capsidite sont exprimées. Ces protéines sont importées dans le noyau afin d'être assemblées en pro-capsidite et d'encapsider l'ADN viral, cette pro-capsidite s'enveloppe provisoirement de la membrane du noyau. Elle s'enrichit des protéines du tégument dans les saccules de l'appareil de Golgi puis s'enveloppe des membranes du réticulum endoplasmique et quitte la cellule par un mécanisme d'exocytose (5).

c. Latence et réactivité

L'ADN viral est détecté dans toutes les cellules myéloïdes durant l'infection latente. Ce n'est que lors de la différenciation des cellules progénitrices CD34+ en macrophages ou en cellules dendritiques que l'expression de l'IE est identifiable. L'hypothèse actuelle est que le virus va initier sa phase de latence dans les cellules progénitrices CD34+ (47). La latence s'établit dans les monocytes / macrophages (sanguins, rénaux, pulmonaires) et probablement aussi dans les cellules endothéliales. Le génome viral est sous forme d'épisome. Ainsi chez le sujet immunocompétent séropositif : on constate des taux élevés de CD8+ spécifiques du HCMV contrastant avec des charges virales HCMV (ADNémies) négatives (plasma sanguin) ou très faiblement positives (1 /10 000 monocytes infectés) (48).

II. Infection materno-fœtale à cytomégalo virus

1. Epidémiologie de l'infection materno-fœtale à HCMV

Le HCMV étant un virus enveloppé, il est fragile et ne persiste pas dans le milieu extérieur. La transmission s'effectue par contact direct avec des fluides biologiques contaminés tels que la salive, les urines, les larmes, le sang, le lait maternel... (49–51). La contamination sexuelle (présence du HCMV dans le tractus génital mais aussi dans le sperme) et le contact avec les enfants en bas âge (présence de HCMV dans l'urine, dans la salive...) sont les deux types d'exposition les plus importants (52,53). La transmission verticale s'effectue de façon transplacentaire au cours de la gestation après infection du placenta dans les suites d'une virémie maternelle. Les facteurs de risque d'infection maternelle pendant la grossesse sont le contact avec des enfants de moins de 2 ans, le jeune âge maternel, le bas milieu socio-économique ainsi qu'une atteinte de l'immunité maternelle (ex : HIV) (54–56). La séroprévalence se situe entre 50 et quasiment 100% en fonction des zones géographiques, des ethnies, des conditions socio-démographiques (57–59). Ce pourcentage est fortement lié aux conditions sanitaires et aux modes de transmission du virus. En France, une étude récente rapporte une séroprévalence de 46% chez les femmes de 15 à 49 ans (60) et le risque de séroconversion pendant leur grossesse a été évalué entre 0,6 à 1,4% (60,61). Après une primo infection maternelle, le risque de transmission au fœtus est de l'ordre de 40% (62). Plus la séroconversion maternelle a lieu tard pendant la grossesse, plus la transmission au fœtus semble élevée (36% au 1^{er} trimestre versus 78% au 3^{ème} trimestre de grossesse) (63). Une infection fœtale peut survenir après une primo-infection maternelle mais aussi après une

infection maternelle secondaire. Les infections maternelles secondaires surviennent chez des femmes connues séropositives avant la grossesse et peuvent être liées à des réactivations de la souche de HCMV endogène latente ou à une réinfection par une nouvelle souche. La possibilité de réinfection d'un individu avec une nouvelle souche de HCMV a été rapportée il y a plus de 30 ans et des études récentes basées sur des réactivités sérologiques spécifiques de souche suggèrent que la réinfection avec une nouvelle souche serait la cause la plus fréquente d'infection maternelle secondaire (64,65). L'existence de réinfection s'explique probablement d'une part par le caractère incomplet de la réponse immunitaire contre le HCMV et d'autre part par la très grande variabilité génétique de ce virus. La transmission fœtale au décours d'une infection maternelle secondaire serait de l'ordre de 1,4% (66).

L'infection congénitale à HCMV représente environ 0,7% des naissances vivantes dans le monde (66). Une étude récente française (protocole CYMEPEDIA) retrouve une prévalence de 0,38% en Ile-de-France. Au sein d'une population de nouveau-nés infectés, le ratio entre les infections congénitales liées à une primo-infection maternelle et celles liées à une infection maternelle secondaire varie en fonction de la séoprévalence chez les femmes enceintes. Ainsi dans les pays du sud à haute séoprévalence (>95%), la très grande majorité des infections néonatales survient dans un contexte d'infection maternelle secondaire. Dans les pays à séoprévalence intermédiaire (\approx 70%) comme les USA, il a été estimé qu'environ 25% des infections congénitales surviendraient après une primo-infection maternelle et 75% après une infection maternelle secondaire (67). En France, la séoprévalence chez les femmes enceintes est d'environ 50% et dans l'étude CYMEPEDIA 55% des infections congénitales dépistées sont survenues après une primo-infection maternelle et 45% après une infection maternelle secondaire.

Entre 10 à 15% des nouveau-nés infectés sont symptomatiques à la naissance et présentent des tableaux de sévérité variable associant des signes d'infections généralisées (hépatosplénomégalie, thrombocytopénie, purpura) à des signes d'atteintes neurologiques (microcéphalie, surdité...). Les séquelles à long terme chez ces nouveau-nés symptomatiques sont essentiellement un retard psychomoteur dans 60% des cas, une atteinte auditive dans 50% des cas et une atteinte visuelle dans 20% des cas (68–73). Parmi les nouveau-nés asymptomatiques, 10 à 15% sont à risque de développer des séquelles auditives (74). *Figure 4.*

Les infections fœtales liées à une infection maternelle secondaire semblent tout autant responsables de morbidité fœtale que les infections maternelles primaires. Une des premières études avait rapporté que le taux de séquelles était très supérieur chez des enfants infectés

après primo-infection maternelle que chez ceux infectés après infection maternelle secondaire (25% versus 8%), de même le taux de déficit auditif était de 15% versus 5% dans ces 2 groupes (75). Cependant, des publications ultérieures relativisent ces données notamment concernant les déficits auditifs qui semblent aussi fréquents après les 2 types d'infections maternelles (76). La série française (CYMEPEDIA) confirme ces résultats avec une prévalence de 9% de déficit auditif à la naissance sur l'ensemble de la population dépistée positive et une prévalence similaire de 8% et 10% respectivement après primo-infection maternelle et après infection maternelle secondaire.

La littérature suggère que plus l'infection survient tard dans la vie utérine moins les risques de séquelles seraient importants, ainsi plusieurs études rapportent l'absence de nouveau-nés symptomatiques chez des fœtus infectés après 25 semaines de gestation (77–80). Par ailleurs, une étude belge rapporte que parmi 35 enfants dépistés infectés à la naissance dans le cadre d'un dépistage systématique de 15000 nouveau-nés, aucun des 11 enfants qui avaient été infectés au décours d'une primo-infection maternelle au 3ème trimestre n'avait développé de déficit auditif dans leurs 3 premières années de vie (81).

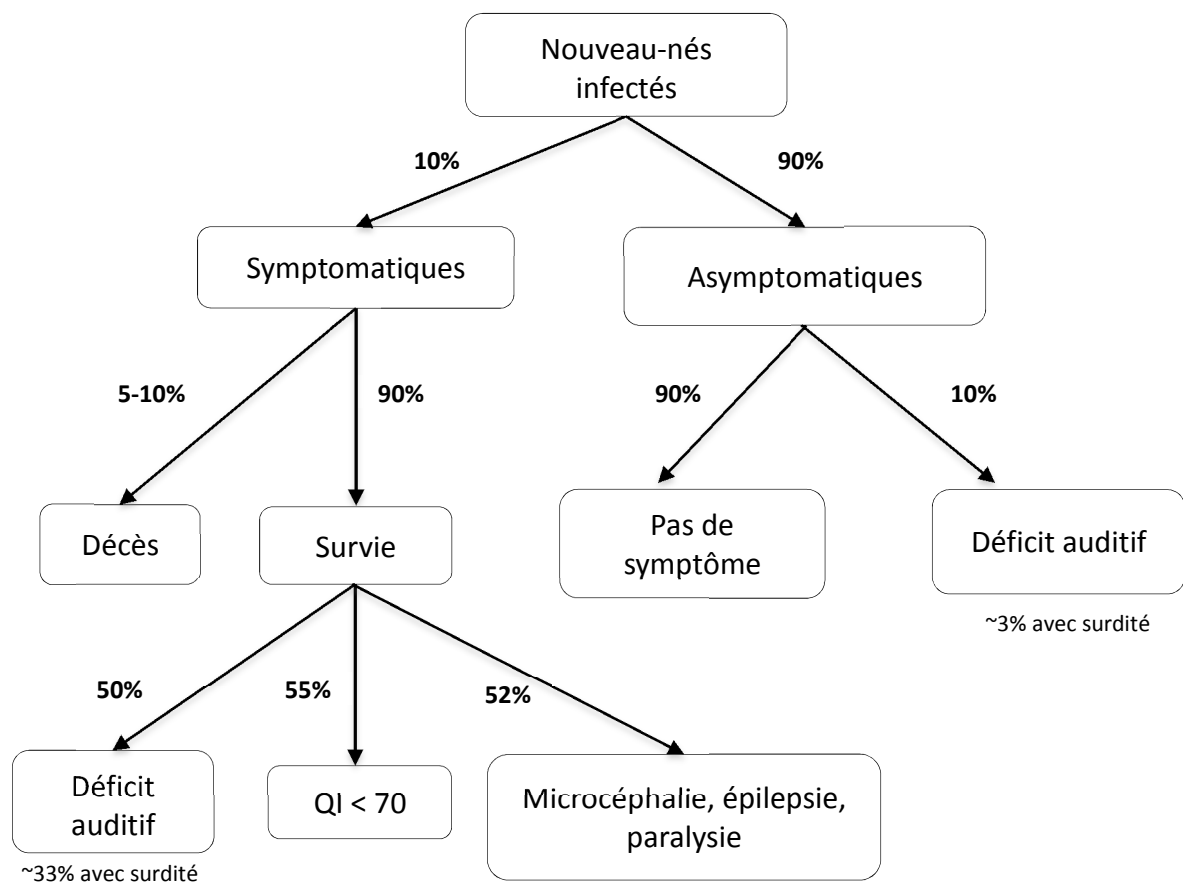


Figure 4 : Devenir d'un nouveau-né infecté, QI : Quotient Intellectuel

2. Manifestations cliniques

a. De l'infection maternelle

L'infection à HCMV chez les adultes, notamment pour les femmes enceintes ne donne pas de signes cliniques spécifiques. Le symptôme le plus caractéristique est la présence d'une fièvre modérée prolongée et bien tolérée. Cette fièvre peut s'associer à des myalgies (entre 30 à 50%), des céphalées (environs 26%), une asthénie, des symptômes respiratoires hauts ou un rash. Une hépatite cytolytique est très fréquente. L'interrogatoire des femmes enceintes retrouve des symptômes cliniques dans 30 à 50% des cas (82).

b. De l'infection fœtale

La grande majorité des fœtus infectés sont asymptomatiques. Ainsi, dans une étude prospective portant sur 662 cas de primo-infections maternelles avec 154 fœtus infectés, seulement 15% de ces fœtus présentaient des signes échographiques (83). Plusieurs signes aspécifiques peuvent alerter et orienter le diagnostic en faveur d'une infection fœtale tel qu'un retard de croissance intra-utérin (RCUI). Le premier organe infecté est le placenta avec un taux de 100% lors d'une infection congénitale à HCMV (84). Il peut être épaissi, avec la présence de calcifications (zones hyperéchogènes) coexistant avec des zones hypoéchogènes. Ensuite d'autres organes peuvent être touchés comme l'intestin avec une entérocolite se manifestant à l'échographie par un intestin hyperéchogène. Une hépatosplénomégalie peut témoigner d'une hépatite fœtale qui peut se compliquer d'insuffisance hépatique avec apparition d'une ascite, voire d'une anasarque. Un oligoamnios ou un hydramnios peuvent témoigner d'une atteinte rénale. Mais les signes les plus évocateurs et qui font toute la gravité de l'infection congénitale à HCMV sont les signes de l'atteinte cérébrale. Ces signes peuvent être des signes mineurs tels que des kystes sous épendymaires ou une vascularite des vaisseaux thalamiques (aspect en chandelier) ou des signes majeurs tels que des troubles de la gyration, une microcéphalie, une dilatation des ventricules cérébraux, un cloisonnement des ventricules, des calcifications ou une leucomalacie (83,85,86). Dans les cas les plus graves l'atteinte fœtale par le HCMV peut entraîner une mort fœtale *in utero*.

c. De l'infection du nouveau-né

10% des nouveau-nés infectés *in utero* sont symptomatiques à la naissance. A la naissance, les signes cliniques, non spécifiques, mais qui doivent faire penser à une infection à HCMV sont l'hypotonie, une microcéphalie, des pétéchies, un purpura (« blue berry muffin baby »), une hépatosplénomégalie, un ictère, un strabisme, une atrophie optique, une chorioretinite,

une surdité (70,87,88). L'infection congénitale à HCMV est la première cause de surdité de l'enfant, d'origine infectieuse et non génétique. Elle représente environ ¼ de toutes les surdités à la naissance (81,89–91). En France, 15% des surdités bilatérales profondes du nourrisson sont dues au HCMV (92).

3. Le diagnostic virologique

a. De l'infection maternelle

Le diagnostic de la primo infection à HCMV chez la femme enceinte repose sur la sérologie qui se fera sur signes d'appels échographiques et/ou cliniques en l'absence de dépistage systématique pendant la grossesse (68,93,94). La sérologie maternelle repose sur la recherche des IgG ainsi que des IgM. La recherche est effectuée par des méthodes ELISA (enzyme-linked immunosorbent assay). La primo infection est définie par l'apparition d'IgG chez un sujet antérieurement séronégatif : c'est la séroconversion, ou par la co-existence d'IgG et IgM associées à un index d'avidité des IgG bas (56,66,95,96). En effet, la présence des IgM n'est pas suffisante pour diagnostiquer une primo-infection récente. Les IgM peuvent être liées à une réactivation virale (68), elles peuvent aussi être persistantes : ainsi après une primo infection les IgM persistent pour une durée variable selon les individus qui peut être prolongée jusqu'à plus de 12 mois (97). Par ailleurs, des IgM CMV peuvent être dues à une réaction non spécifique du système immunitaire ou à une réaction sérologique croisée. L'index d'avidité des IgG est donc indispensable pour dater l'infection. L'avidité des IgG spécifiques pour les antigènes viraux augmente au cours de la réponse immunitaire : en début d'infection, l'indice d'avidité des IgG est faible, et plus on s'éloigne du début de l'infection, plus il est élevé. La mesure de l'indice d'avidité repose sur l'utilisation d'agents dénaturants (en général, l'urée à concentration élevée) dans des tests de type ELISA. L'agent dénaturant est alors, soit inclus dans le diluant du sérum pour empêcher la formation de complexes antigène/anticorps (principe de dilution), soit ajouté aux solutions de lavage après la formation des complexes antigène/anticorps (principe d'élution). Il est ainsi possible d'obtenir pour un même sérum une mesure d'absorbance avec et sans utilisation de l'agent dénaturant, *Figure 5.*

L'avidité est alors calculée de la façon suivante :

L'indice d'avidité (%) = (Densité optique (DO) en présence d'agent dénaturant / DO sans agent dénaturant) X 100.

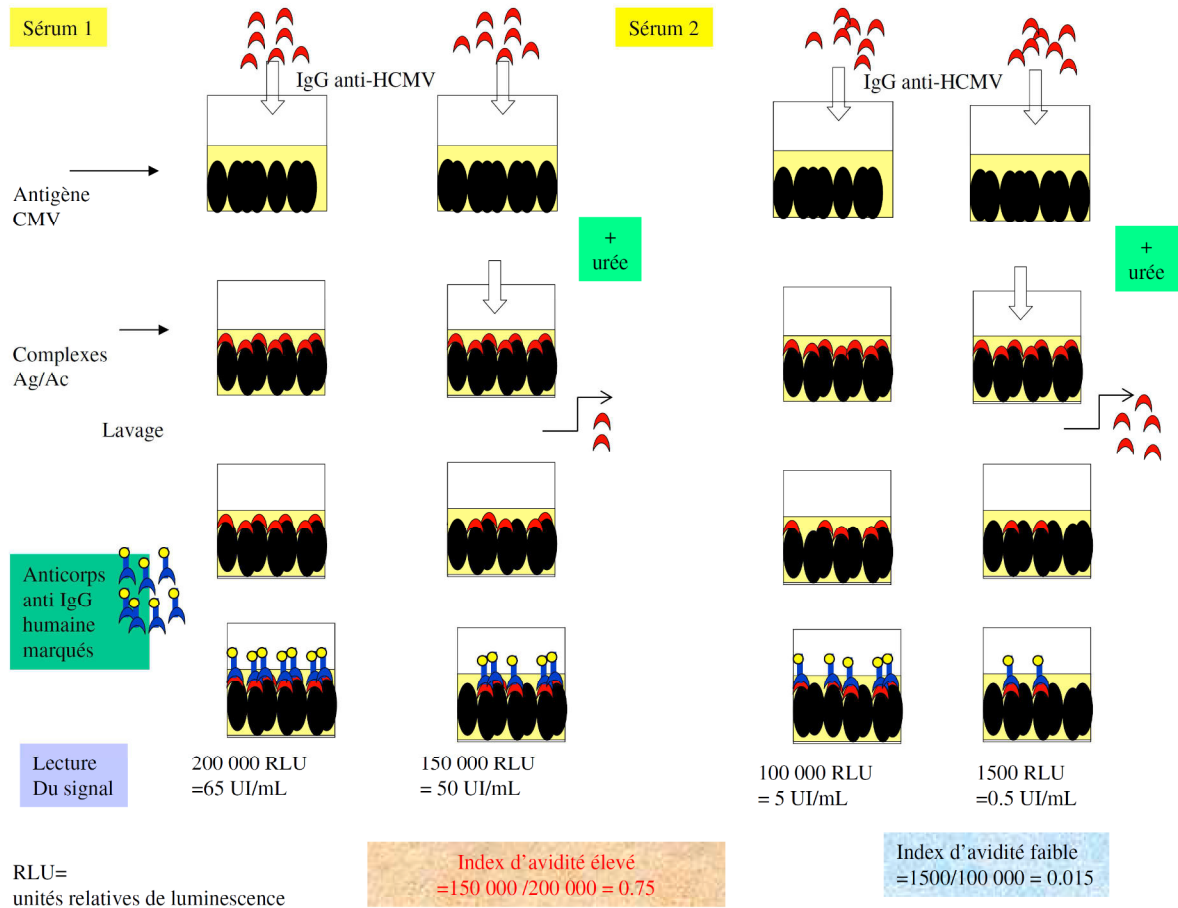


Figure 5 : Schéma du principe du test d'avidité. L'urée va fragiliser les liaisons labiles. Lors d'un lavage, les anticorps qui ne sont pas ou peu fixés par des liaisons labiles aux antigènes vont être éliminés, seules les interactions fortes antigène-anticorps resteront. Le test d'avidité repose sur le ratio des densités optiques urée/sans urée.

En fonction du résultat de l'indice d'avidité, l'infection à CMV est classée dans 3 catégories : ancienne (plus de 3 mois), récente (moins de 3 mois) ou intermédiaire (datation impossible) (56,68,93). L'indice d'avidité est également fonction des individus testés ainsi que des techniques utilisées. En effet, si en général celles-ci permettent d'exclure une primo-infection datant de moins de 3 mois, les valeurs des seuils d'exclusion peuvent être différentes d'une

technique à l'autre et ne sont donc pas comparables entre elles. Ainsi la qualité d'un test d'avidité et son interprétation restent dépendantes des trousse diagnostiques utilisées dans les laboratoires (98,99). La concordance entre les interprétations des résultats (avidité faible, intermédiaire ou forte) entre les différentes trousse commerciales d'avidité n'est pas toujours bonne. Revello *et al.* avaient comparé 8 tests commerciaux d'avidité IgG HCMV et avaient trouvé une faible concordance suggérant qu'une standardisation de ces tests était impérative (100,101). L'indice d'avidité peut également être erroné lorsque le taux des IgG est faible (102). Etant donné que l'index d'avidité des IgG permet d'évoquer ou d'exclure une primo-infection dans les 3 mois précédents, le résultat de l'avidité sera donc à interpréter en fonction du terme de la grossesse. Un test d'avidité dans les 14 premières semaines d'aménorrhée possède une sensibilité de 93-100% pour le diagnostic d'une primo-infection pendant le premier trimestre de la grossesse. *Figure 6.*

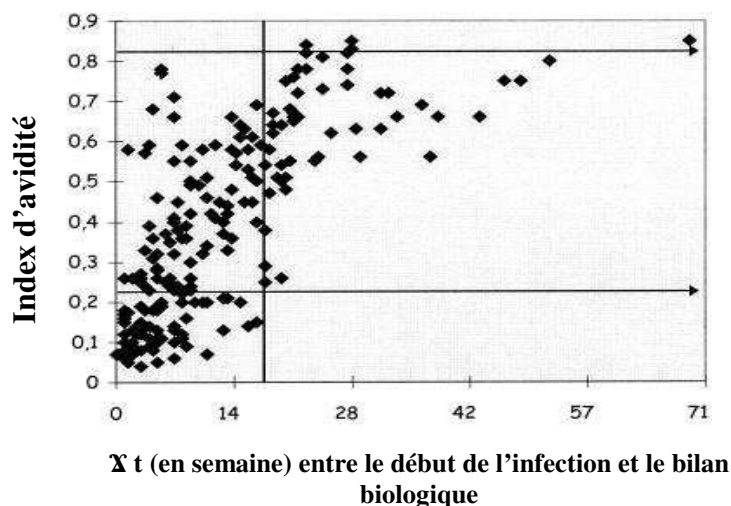


Figure 6 : Augmentation de l'index d'avidité des IgG en fonction du délai (en semaines) entre le début de l'infection à CMV et le prélèvement. D'après Baccard-Longere, 2001 (103).

Le dosage de l'ADN sanguin maternel par PCR (Polymerase Chain Reaction) quantitative en temps réel pourrait aider au diagnostic et à la datation de la primo-infection. En effet, toutes les femmes enceintes faisant une primo-infection ont de l'ADN viral détectable dans leur sang dans le premier mois de la primo-infection et cette ADNémie dure 85 jours en médiane (de 33 à 194 jours) (100,101). Cependant, le niveau d'ADNémie est relativement faible avec une médiane de 56 copies/ml avec des extrêmes allant de 25 à 6762 copies/ml (101). L'intérêt de ce dosage de l'ADNémie sanguine dans le cadre du diagnostic de la primo-infection maternelle mériterait d'être étudié.

Il est impossible d'établir le diagnostic d'une réinfection ou d'une réactivation virale chez la femme enceinte avec les moyens diagnostiques actuels (68).

b. De l'infection fœtale

Six à huit semaines après une infection à CMV, le fœtus infecté excrète du virus dans les urines fœtales et donc dans le liquide amniotique (LA). Le diagnostic de l'infection fœtale à CMV repose sur la détection du génome viral dans le LA par PCR. Une amniocentèse (ponction de liquide amniotique) sera proposée idéalement après 21 SA et au moins 6 à 7 semaines après l'infection maternelle (104–106). *Figure 7*. La PCR est la technique de référence du diagnostic prénatal et les techniques de PCR quantitative permettent de quantifier la charge virale. La sensibilité du diagnostic prénatal s'il est pratiqué dans des bonnes conditions (soit après 21 semaines et 7 semaines après la date présumée de la primo-infection maternelle) est d'environ 90% avec une spécificité proche de 100%, et une valeur prédictive positive proche des 100% (104,105,107–109). Les 5 à 10% de faux négatifs sont liés à un passage tardif du virus après 21 semaines. Une étude récente réalisée sur 2 sites (en Israël et en France) rapporte que chez 43 nouveau-nés infectés, dont le dépistage anténatal avait été négatif, aucune séquelle neuro-sensorielle n'était constatée à 2 ans de suivi, ces cas ont donc un très bon pronostic (110).

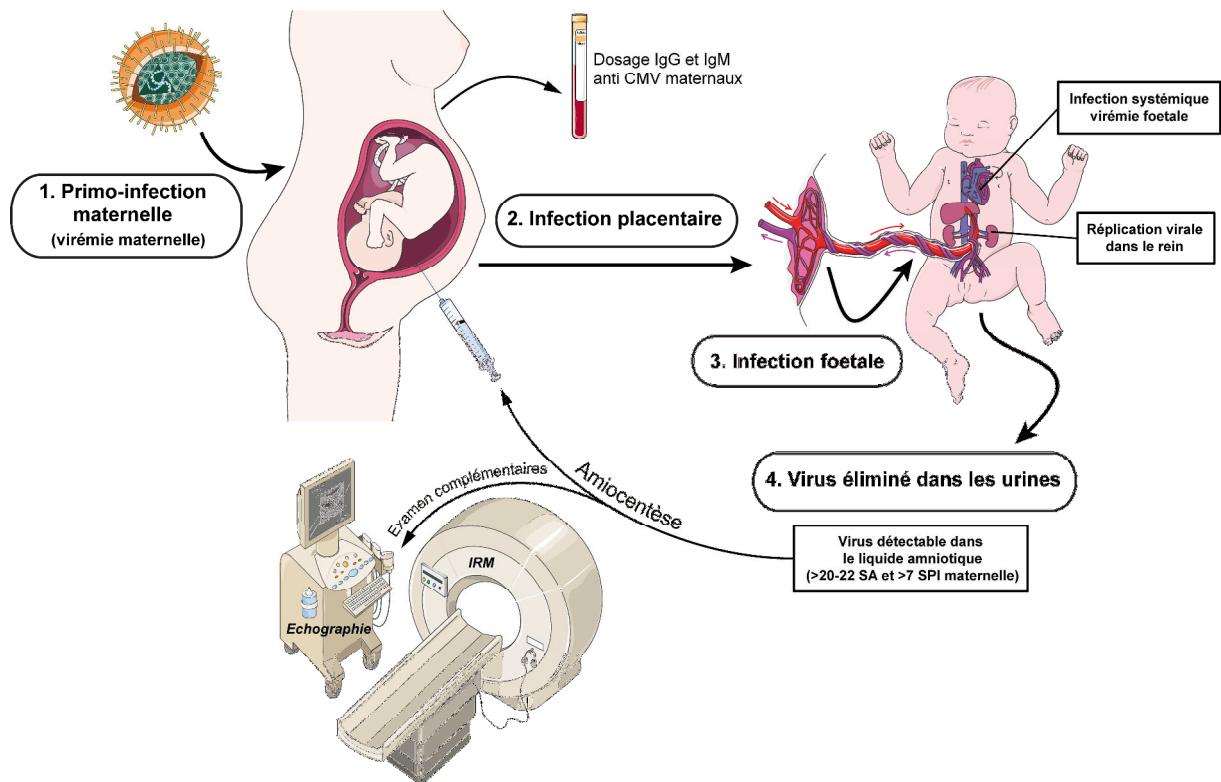


Figure 7 : Rappel physiopathologique de l'infection fœtale à CMV qui permet de préciser pourquoi le virus est recherché dans le liquide amniotique 6-8 semaines après une infection et après 21 SA (maturation des reins). Images adaptées de Servier medical art.

c. De l'infection chez le nouveau-né

En présence de signes d'appels cliniques, le diagnostic doit être confirmé au plus tôt après la naissance dans les 15 à 21 premiers jours de vie. Au-delà, il sera difficile de savoir si l'infection est pré ou post natale (infection par le biais de l'allaitement maternel), ce qui n'a pas les mêmes conséquences, l'infection postnatale étant bénigne (97). Le diagnostic de l'infection congénitale à HCMV chez le nouveau-né repose sur la détection du virus dans les urines, ou dans la salive par PCR (97,111). En effet, le HCMV étant largement excrété dans la salive, un échantillon de salive est une alternative au prélèvement d'urine avec une sensibilité proche de 100% et une spécificité autour de 95% (112,113). Cependant, le prélèvement salivaire doit être fait à distance d'une tétée car le lait maternel est infecté par le HCMV (56).

4. Diagnostic rétrospectif de l'infection congénitale à HCMV

Lorsque le diagnostic néonatal n'a pas été pratiqué et qu'un jeune enfant présente des signes cliniques compatibles avec une infection congénitale à HCMV (signes neurologiques ou surdité), le seul moyen de certitude pour faire le diagnostic rétrospectif de l'infection

congénitale à HCMV est de tester le sang séché conservé sur les cartes de Guthrie, en sachant qu'en France les cartons de Guthrie sont conservés entre 6 mois et 2 ans suivant les centres de dépistage. La PCR HCMV sur sang séché sur carte de Guthrie a une sensibilité selon les techniques d'extraction et d'amplification utilisées de 30 à 96% et une spécificité de 99% lorsqu'elle a été comparée à la technique de PCR sur échantillon de salive (114). Dans une étude réalisée dans une population de nouveau-nés à haut risque d'infections congénitales à HCMV (nés de mère ayant fait une primo-infection pendant la grossesse et/ou ayant des symptômes compatibles), la PCR sur les cartes de Guthrie avait une sensibilité, une spécificité, et des valeurs prédictives négative et positive de 95% , 99%, 98,5% et de 94% respectivement) comparée à la PCR dans un échantillons d'urine (115).

5. Bilan pronostic de l'infection fœtale

Le pronostic fœtal doit être établi après un bilan complet sachant que seulement 10 à 20% des fœtus infectés vont être symptomatiques à la naissance et/ou développer des séquelles à long terme. Le pronostic fœtal est établi au diagnostic de l'infection par une combinaison des résultats de l'imagerie et de la biologie fœtale. Lorsque des signes d'atteinte cérébrale sévère sont présents dès le diagnostic, le pronostic est mauvais, conduisant souvent à une Interruption Médicale de Grossesse (IMG) (116,117). Le pronostic d'un fœtus infecté ne présentant aucun signe décelé à l'imagerie est bon avec une valeur prédictive négative de l'imagerie fœtale entre 95 et 100% selon les études (118–121). Le pronostic des fœtus présentant des signes échographiques extra-cérébraux est plus difficile à établir : dans une étude de 2008, la probabilité d'être symptomatique à la naissance était augmentée par un facteur 7, si de tels signes étaient vus à l'échographie (118) mais la valeur prédictive positive de ces signes pour une mauvaise issue à la naissance n'était que de 54%. Les valeurs prédictives négative et surtout positive de l'imagerie fœtale ne sont donc pas suffisantes, laissant un champ pour le développement d'autres marqueurs prédictifs. Deux études ont rapporté l'intérêt du dosage du taux de plaquettes fœtales dans ce contexte : dans une étude un taux de plaquettes fœtales $< 50\ 000/\text{mm}^3$ avait une valeur positive de 80% pour prédire un état symptomatique à la naissance (122), une autre étude rapportait un plus mauvais pronostic lorsque les plaquettes étaient inférieures à $100\ 000/\text{mm}^3$ (118).

Le niveau de la charge virale dans les prélèvements fœtaux périphériques (sang fœtal et liquide amniotique) est intéressant à étudier car il pourrait avoir une valeur pronostique. En effet, un lien entre charge virale élevée et maladie à HCMV est bien documenté chez

l'immunodéprimé. Ainsi, il a été montré qu'en transplantation d'organe, le risque de maladie à CMV augmente lorsque la charge virale initiale est plus élevée (123). De même chez les patients infectés par le VIH au stade de SIDA, plus la charge virale HCMV est élevée plus le risque de décès augmente (124). Ainsi, dans le cadre de la transplantation et de l'infection au VIH, la mesure de la charge virale HCMV est un outil utilisé pour faire le diagnostic d'une infection active à CMV, pour évaluer la réponse au traitement, le risque de rechute et décider de l'arrêt du traitement. Cependant, il reste impossible d'établir des seuils universels de charge virale au-delà desquels recommander un traitement notamment dans le cadre de la transplantation. Cette impossibilité est essentiellement liée à l'absence d'harmonisation des techniques d'un laboratoire à l'autre. La technologie utilisée par la quasi-totalité des laboratoires de virologie pour la quantification de l'ADN viral est la PCR en temps réel. De nombreuses trousse commerciales plus ou moins automatisées sont disponibles pour réaliser ces tests de PCR HCMV quantitatifs et ont progressivement remplacé les tests « maisons » développés par les laboratoires. Cependant, la quantification peut être influencée par toutes les étapes de réalisation de ces tests (méthode d'extraction des acides nucléiques, réactifs et automate d'amplification, gamme de quantification). Par ailleurs, le niveau de précision intrinsèque de la technique de PCR temps réel implique que seules des variations de $\pm 0,5 \log_{10}$ copies/ml indiquent un changement biologique significatif et à noter que pour des charges virales basses proches du seuil de détection des techniques, seules des variations de $\pm 0,7 \log_{10}$ copies/ml sont significatives (125). Depuis 2010, un standard de quantification établi par l'OMS (Organisation Mondiale de la Santé) est disponible pour aider à l'harmonisation des résultats de charge virale d'un laboratoire à un autre, en exprimant les résultats en UI/ml (126).

Dans le contexte de l'infection congénitale à HCMV, l'intérêt de la quantification de la PCR HCMV dans les prélèvements fœtaux périphériques a été peu étudié. Dans une étude, une valeur élevée de la charge virale sanguine fœtale $> 30\,000$ copies/ml ($4,47 \log_{10}$) semblait de mauvais pronostic (122) alors qu'au contraire dans une autre série aucun lien entre sévérité de l'infection fœtale et niveau de charge sanguine fœtale n'avait été mis en évidence (85). De nouvelles études sont donc nécessaires pour confirmer ou infirmer l'intérêt de la charge virale sanguine fœtale et essayer de définir une valeur seuil exprimée en UI/ml qui soit potentiellement utilisable quelle que soit la technique de PCR quantitative utilisée.

Aucun lien, dans plusieurs études, n'a été retrouvé entre le niveau de la charge virale dans le liquide amniotique et le pronostic (127–129). Ceci s'explique probablement par le fait que

l'ADN viral s'accumule dans le liquide amniotique (129). Afin de s'affranchir de ce biais, il serait intéressant d'étudier la valeur prédictive de la charge virale dans le liquide amniotique après ajustement avec l'âge gestationnel au moment du prélèvement de liquide amniotique et avec le délai entre primo-infection maternelle et amniocentèse.

6. Prise en charge de l'infection materno-fœtale à HCMV

Le Conseil Supérieur d'Hygiène Publique de France (HSCP) en 2002 (www.hcsp.fr/explore.cgi/a_mt_080302_CMV_grossesse.pdf) puis la Haute Autorité de Santé (HAS) en 2004 (http://www.has-sante.fr/portail/upload/docs/application/pdf/CMV_synth.pdf.) avaient émis des recommandations concernant le dépistage et la prise en charge d'une infection materno-fœtale à HCMV. Il a été admis que le dépistage systématique du HCMV pendant la grossesse ne devait pas être effectué au vu des connaissances disponibles à cette époque (2002 et 2004). Ces rapports insistent sur la place de la prévention primaire basée sur une liste non exhaustive de conseils d'hygiène qui doit être donnée par le personnel soignant aux femmes enceintes. Lorsque la suspicion de l'infection à HCMV est confirmée par la sérologie IgG et IgM maternelle, l'HAS précise que la prise en charge de l'infection materno-fœtale doit être réalisée par une équipe multidisciplinaire ou dans un centre de diagnostic prénatal. Une amniocentèse suivie d'une recherche de CMV dans le liquide amniotique par culture virale et PCR doivent être réalisées en cas de signes échographiques évocateurs. L'échographie de surveillance (sans proposition de fréquence indiquée) doit être proposée, l'interruption médicale de grossesse peut être discutée. En 2004, la mesure de la charge virale dans le liquide amniotique, la ponction de sang fœtal ainsi que l'IRM fœtale étaient en cours d'évaluation.

Bien que les connaissances concernant l'infection congénitale à HCMV et sa prise en charge aient beaucoup progressé en 12 ans, aucune nouvelle recommandation nationale n'a été élaborée. Au regard des connaissances actuelles sur la prise en charge de l'infection congénitale à HCMV et compte tenu des recommandations nationales, anciennes et non actualisées, un algorithme de décision a été élaboré dès 2009 à l'hôpital universitaire Necker enfants-malades. *Figure 8.*

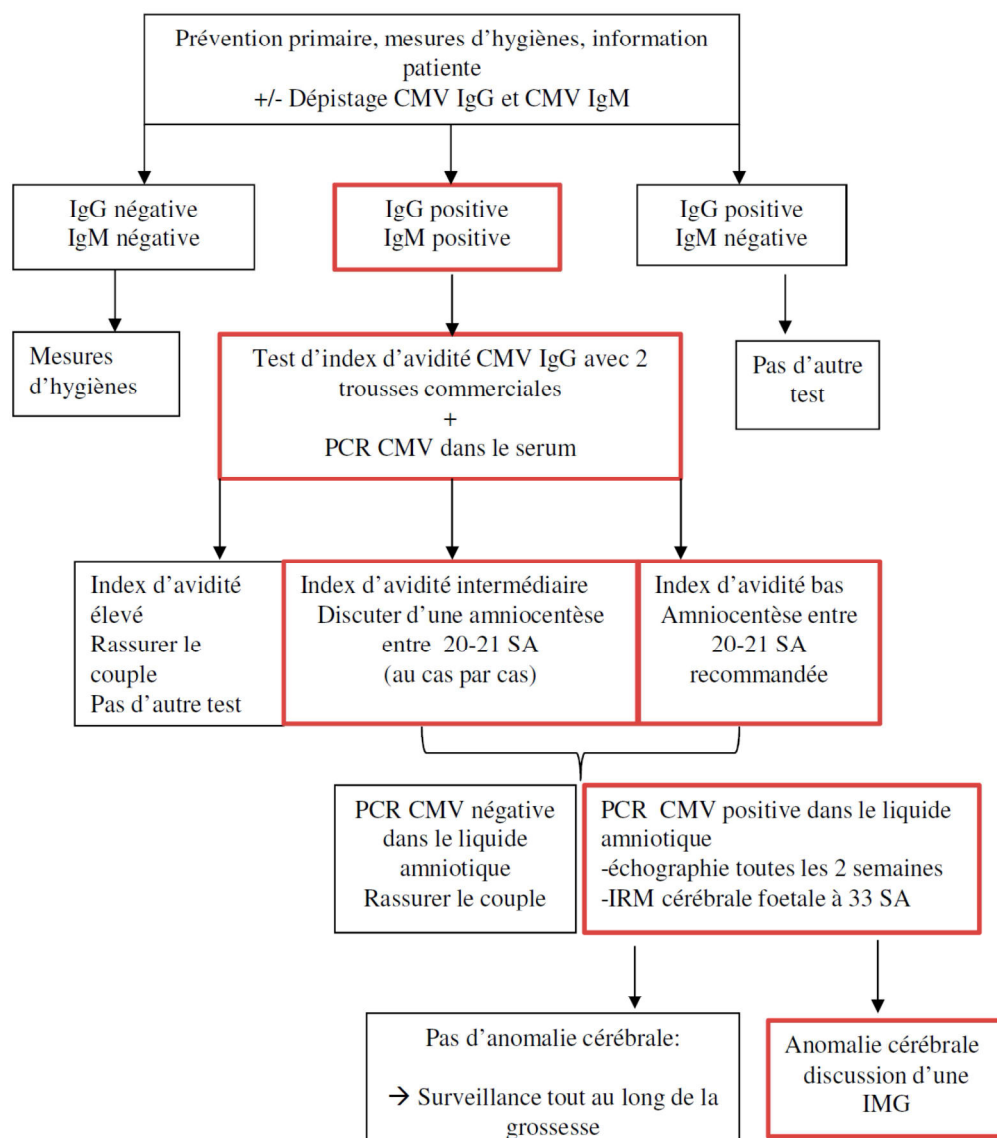


Figure 8 : Algorithme de prise en charge du dépistage à la prise en charge d'une infection materno-fœtale à CMV.

7. Traitements

Les antiviraux peuvent être utilisés sous certaines conditions pour traiter les nouveau-nés infectés. En revanche, il n'existe à l'heure actuelle que peu de données concernant le traitement d'une infection congénitale à HCMV pendant la grossesse (130). Deux stratégies sont actuellement à l'étude pour le traitement anténatal : l'utilisation d'immunoglobulines hyper-immunes pour prévenir la transmission de la mère au fœtus en cas de primo-infection maternelle et l'utilisation d'antiviraux pour traiter un fœtus déjà infecté.

a. Le traitement préventif de la transmission au fœtus par les immunoglobulines hyper-immunes

Une étude pilote non randomisée, publiée en 2005 avait suggéré l'efficacité de l'injection d'immunoglobulines hyper-immunes sur la transmission de la mère au fœtus en cas de primo-infection (131). Cependant, une étude randomisée récente montre l'absence d'efficacité de ce traitement préventif (132). Une autre étude est en cours aux Etats-Unis d'Amérique.

b. Le traitement antiviral pour les fœtus infectés

L'idée est de traiter des fœtus infectés présentant des signes échographiques extra-cérébraux d'infection généralisée avant que des atteintes irréversibles cérébrales ne soient constituées.

Le ganciclovir est la molécule anti-CMV de choix contre le HCMV dans le contexte de l'allogreffe. Cependant le ganciclovir est contre indiqué chez la femme enceinte en raison de son potentiel effet tératogène et de son intolérance hématopoïétique (133–136).

L'acyclovir/valaciclovir a démontré son efficacité *in vivo* pour prévenir l'infection à HCMV chez l'allogreffé (137,138). Cette molécule a été largement utilisée chez la femme enceinte depuis de nombreuses années et la pharmacovigilance démontre son innocuité chez le fœtus (139). Il a été démontré que le valaciclovir administré à la mère, à raison de 8 grammes par jour permettait d'obtenir des concentrations thérapeutiques chez le fœtus et de diminuer la charge virale dans le sang fœtal (140). Un premier essai ouvert avec un seul bras (Cymeval II) a permis de montrer l'innocuité chez la mère et le fœtus de ce dosage élevé de valaciclovir ainsi qu'une efficacité thérapeutique chez des fœtus modérément symptomatiques avec une diminution de la proportion de nouveau-nés symptomatiques par rapport à une cohorte historique (141).

c. Le traitement néonatal par le ganciclovir/valganciclovir

Un traitement néonatal de 6 semaines par le ganciclovir et le valganciclovir est recommandé chez les nouveau-nés infectés et symptomatiques avec des signes neurologiques (135,142). Dans ces conditions, le traitement a montré un bénéfice modeste mais réel avec amélioration ou stabilisation de l'audition et amélioration des acquis neurosensoriels.

III. Immunité et HCMV

Les réponses innée et adaptative collaborent pour lutter efficacement contre le HCMV

1. La réponse immunitaire innée

L'immunité innée intervient dès la phase d'attachement et de fusion du virus à la membrane plasmique de la cellule par l'intermédiaire des Toll-Like Receptors (TLR) notamment les TLR 2,3 et 9. Il a été montré que les protéines gB et gH pouvaient se fixer sur les TLR2 entraînant ainsi une sécrétion de NFκB (Nuclear Factor kappa B) (143). *In vivo*, le rôle du TLR2 semble important puisqu'il a été montré que le polymorphisme génétique de ce gène était associé à des maladies à HCMV plus sévères chez les transplantés de foie (144).

L'activation du système immunitaire inné va induire la production de cytokines pro-inflammatoires (145–147) qui va permettre l'activation des macrophages, des cellules Natural Killer (NK) et des cellules dendritiques. Les macrophages ainsi que les cellules dendritiques vont activer la réponse immunitaire adaptative tandis que les cellules NK vont acquérir des caractéristiques cytotoxiques une fois exposées au virus (146).

Les cellules dendritiques, sécrètent des cytokines notamment de l'interféron γ (IFN γ) qui va activer la réponse adaptative (lymphocytes T et B). Néanmoins, le HCMV pourrait inhiber en partie l'action des cellules dendritiques, en effet *in vitro* 1) il empêche la différenciation des monocytes, précurseurs des cellules dendritiques appelés moDC (monocyte-dendritic cells) en cellules dendritiques (148) et 2) il diminue la production de cytokines et l'expression des CMH (149,150).

Les macrophages, sont des cellules cibles du HCMV (151,152) et leur rôle dans la transmission verticale du CMV n'est pas encore complètement défini (146). Il a été suggéré que les macrophages pourraient potentialiser l'infection et la propagation du CMV dans les syncytiotrophoblastes (153).

Les cellules NK, jouent un rôle crucial dans la réponse immunitaire contre l'infection à HCMV (154). Les NK de façon physiologique sont en équilibre entre des systèmes d'inhibition et d'activation (154). Mais lors d'une infection, notamment à HCMV, les fonctions et le phénotype des NK changent et ils deviennent cytotoxiques (155,156). Les NK libèrent alors des perforines et du granzyme qui vont lyser les cellules infectées. Les NK vont

également moduler la réponse adaptative en interagissant avec les cellules dendritiques et macrophagiques (146,157,158) et en produisant des cytokines antivirales (12). L'activité des NK augmente lors de la phase aiguë de l'infection mais aussi lors des réactivations, indiquant la contribution des NK dans l'infection à HCMV (159). Les molécules activatrices des NK sont des récepteurs de la famille des C-type Lectines tels que les NKG2D, NKG2E, NKG2C mais également des récepteurs de la famille des « Natural Cytotoxicity Receptors » (NCR) tels que le NKp44 et le NKp46 (160). Les NKp46 sont présents sur toutes les cellules NK (161), elles induisent un effet cytolytique et permettent la production de cytokines (162). Les NKp46 sont impliqués dans les réponses antivirales et sont des récepteurs majeurs des NK pour la lyse des cellules infectées (162). En l'absence d'infection à HCMV, 10% des cellules NK expriment l'hétérodimère CD94/NKG2C et 90% expriment l'hétérodimère CD94/NKG2A (163,164).

L'hétérodimère CD94/ NKG2C est un récepteur d'activation des NK qui reconnaît l'HLA-E et dont l'expression est stimulée par la protéine UL40 du HCMV(165). Chez l'Homme, l'infection à HCMV est associée à une expansion des NKG2C+ (163,166–170). Par ailleurs, l'infection à HCMV entraîne une expansion spécifique du répertoire des KIRs (Killer cell Immunoglobulin like Receptors) chez des adultes sains (171).

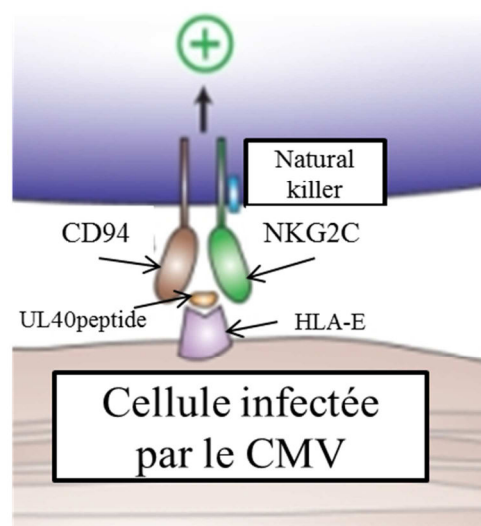


Figure 9 : Reconnaissance moléculaire d'une cellule infectée par le HCMV par les NK via le récepteur C-type Lectine NKG2C. La cellule NK reconnaît l'antigène HLA-E via l'hétérodimère CD94/NKG2C. Lors d'une infection à HCMV, une expansion des NKG2C est observée. d'après Sun JC, 2009 (172).

✓ Particularités de la réponse NK dans l'infection congénitale à HCMV :

L'expansion des NKG2C⁺ a également été observée dans le sang périphérique chez des enfants infectés *in utero* et cette expansion était plus importante dans les cas symptomatiques que dans les cas asymptomatiques (154,173). Dans la population européenne environ 4% des sujets ont une délétion homozygote pour le gène NKG2C et 30% une délétion hétérozygote. Cependant, la fréquence de la délétion des NKG2C était comparable entre les enfants infectés congénitalement par le HCMV et les contrôles (173). De plus, le nombre de NKG2C⁺ et le nombre de NK totaux retrouvés dans la circulation chez les enfants homozygotes étaient comparables à ceux des enfants hétérozygotes. Ces résultats suggèrent que NKG2C⁺ a un impact sur l'homéostasie des populations NK durant l'infection à HCMV tôt dans la vie mais que ce n'est pas un déterminant essentiel de l'infection à HCMV chez les fœtus exposés (154). Par ailleurs, l'expansion plus importante des NKG2C⁺ dans les cas les plus symptomatiques semble paradoxale mais pourrait être le reflet d'un éventuel épuisement de la réponse cellulaire T qui exercerait un rétrocontrôle responsable de cette expansion.

✓ A l'interface materno-fœtale au niveau du placenta :

40% des cellules de la déciduale sont des cellules immunitaires avec au 1^{er} trimestre : environ 70% de NK déciduaux (dNK), 20% de macrophages, 10% de cellules T (CD8⁺, CD4⁺, $\gamma\delta$) et 2% de cellules dendritiques. Les dNK très abondantes au 1^{er} trimestre diminuent au cours du 2^{ème} trimestre. Les dNK sont peu cytotoxiques (CD56^{bright} CD16⁻) dans le cadre de la tolérance immune de la grossesse (155,174,175). Cependant, il a été montré que les dNK détruisaient les fibroblastes déciduaux autologues infectés par le HCMV et que l'infection par le HCMV induisait un changement du répertoire des récepteurs dNK vers un phénotype « actif » (CD56^{dim} CD16⁺ et NKG2C⁺) avec l'acquisition d'une activité cytotoxique. Les dNK pourraient ainsi jouer un rôle important dans la prévention de la transmission materno-fœtale du CMV au niveau du placenta particulièrement au 1^{er} trimestre (155).

✓ La réponse NK n'a pas été étudiée dans d'autres organes fœtaux notamment dans le cerveau fœtal infecté.

2. La réponse immunitaire adaptative cellulaire et humorale

Les réponses de l'immunité adaptative dans le contexte d'une infection congénitale ou périnatale ont été plus explorées que la réponse innée (146). La réponse adaptative fait intervenir la réponse cytotoxique des cellules T et la réponse humorale des lymphocytes B/plasmocytes sécrétant les anticorps dirigés contre les épitopes du virus (5,146).

La réponse à médiation cellulaire T est prédominante dans les mécanismes de défense et de contrôle d'une infection à HCMV, même si elle n'est pas suffisante pour éradiquer le virus. Les lymphocytes CD8, CD4 et $\gamma\delta$ T sont impliqués dans le contrôle et la restriction de la réplication virale (5). *In vitro*, la stimulation des cellules T de sujets séropositifs pour le HCMV par des antigènes viraux, permet une production importante de cytokines (IFN γ , TNF β) mais également de perforine et de granzyme par les lymphocytes T CD4 et CD8 (176,177). Les T CD4 et CD8 sont dirigés contre de très nombreuses protéines virales de structure (capside, tégument, glycoprotéines) et de régulation (protéines impliquées dans la réplication virale et dans l'immuno-évasion) (5). Chez l'adulte, la réponse CD4 vis-à-vis du HCMV est précoce après la primo-infection, orientée Th1 et précède la mise en place et le maintien de la réponse T CD8 (178,179). Le rôle des T CD4 est considéré comme indirect car il alimente la réponse humorale et permet l'expansion de la population des T CD8 (5) mais les T CD4+ sont aussi directement cytotoxiques par la sécrétion d'IFN- γ , l'expression de perforine et granzyme B et induisent l'apoptose des cellules infectées. En transplantation, un faible taux de T CD4 anti-HCMV est corrélé de façon significative au risque de maladie à HCMV(180). Chez les enfants immunocompétents infectés par le CMV une excrétion urinaire et salivaire prolongée est en lien avec un déficit persistant et spécifique en T CD4 (181). La réponse antivirale T CD8+ est primordiale pour le contrôle de l'infection à HCMV. Chez les souris mutantes T CD8-, on observe une dissémination importante du MCMV (Mouse CMV) allant même jusqu'à des maladies parfois létales (5). Chez les personnes transplantées, la réponse des T CD8 permettrait de limiter la virémie et de protéger contre une maladie à HCMV (5).

✓ Chez les fœtus infectés par le HCMV :

Les T CD8 matures (différentiation terminale CD28- et produisant de l'IFN) sont observés *in vivo* dès 22 semaines de gestation (182). L'étude des cellules T CD4 et CD8 dans le sang périphérique de fœtus infectés ou de nouveau-nés infectés *in utero* montrent que l'expansion des cellules T CD4+ différenciées est beaucoup moins importante que chez l'adulte infecté

alors que l'expansion des cellules T CD8+ différenciées est identique dans les 2 groupes (183). En revanche, l'efficacité de la réponse anti-HCMV est diminuée à la fois pour les cellules T CD4+ et pour les cellules T CD8+ chez le nouveau-né infecté par rapport à l'adulte infecté.

Cette moins bonne efficacité se manifeste :

1) par une diminution de l'amplitude du répertoire des cellules T chez le nouveau-né avec un pourcentage d'antigènes HCMV reconnus par les cellules T du nouveau-né très inférieur à celui de l'adulte infecté

2) par une diminution significative de la réponse cytokinique aux antigènes HCMV (sécrétion de IFN γ , IL2 et TNF α) des cellules T du nouveau-né infecté par rapport à l'adulte infecté (183).

Cette pauci-fonctionnalité des cellules T effectrices pourrait s'expliquer par un phénomène d'épuisement des fonctions des lymphocytes T CD8 et des T CD4 comme cela a été décrit dans des infections virales chroniques notamment dans l'infection à VIH ou à VHC (Virus Hépatite C). Les cellules T épuisées perdent la capacité de produire de l'IL2, du TNF et de l'IFN γ et sont porteuses du marqueur PD-1 (Programmed Death-1). PD-1 se lie à son ligand PD-L1, ce dernier est exprimé dans les tissus sains comme le foie, les reins, le cœur, les poumons et les endothéliums vasculaires (184–187) ainsi que sur les cellules macrophagiques, les NK, les cellules dendritiques et les lymphocytes T et B (185,188). Le complexe PD-1 / PD-L1 est un mécanisme de suppression des lymphocytes T activés (189–191).

Dans une étude récente, les cellules CD4+ et CD8+ différenciées du sang périphérique, exprimaient un niveau de PD-1 significativement plus élevé chez le nouveau-né infecté par le CMV que chez l'adulte infecté (en phases aiguë et chronique) (183). Par ailleurs, le blocage du PD-1 augmentait significativement la production de l'IFN γ et de MIP-1 β (Macrophage Inflammatory Protein) par les cellules T, suggérant un rôle de régulation de PD-1 sur la fonction et le contrôle de la réponse des lymphocytes T lors de la présence d'antigènes HCMV (183). Cependant l'expression de PD-L1 n'a pas été vérifiée dans ce travail.

✓ Les réponses cellulaires T dans le cerveau foetal infecté :

Les résultats de deux études concernant les réponses cellulaires T dans le cerveau foetal humain infecté sont rapportés dans la partie dédiée au cerveau foetal dans ce manuscrit. Concernant le PD1 / PD-L1, des données intéressantes sont connues grâce au modèle de post

encéphalite virale de la souris infectée par le MCMV. Les cerveaux infectés sont infiltrés par des lymphocytes T CD8 qui expriment PD-1 alors que la microglie exprime PD-L1 en phase aiguë comme en phase chronique. Dans ce modèle, la neutralisation de PD-1 et de PD-L1 restaure la capacité de la production de l'IFN γ et de l'IL-2 par les lymphocytes T CD8.

La réponse humorale (lymphocyte B, plasmocytes et anticorps) est dirigée contre un panel de protéines du virus notamment contre les glycoprotéines d'enveloppe : la gH et la gB (93,192,193). Un ensemble de données de la littérature obtenu dans les modèles animaux, *ex vivo* et chez l'homme indique que les anticorps neutralisants pourraient jouer un rôle protecteur dans la transmission materno-fœtale du HCMV.

Chez la souris infectée par le MCMV, la neutralisation du virus par les anticorps protègerait d'une primo-infection mais limiterait également la réactivation du virus et protègerait l'hôte contre une infection létale (194,195).

Dans le modèle de transmission materno-fœtale du gpCMV (guinea pig CMV) du cochon d'inde, l'injection d'immunoglobulines anti gpB hyper-immunes diminue la durée de la virémie maternelle, l'infection et l'inflammation du placenta, le pourcentage de décès de nouveau-nés et celui de nouveau-nés infectés (196).

Dans le modèle *ex vivo* de l'explant décidual infecté par le HCMV, la réplication virale est significativement diminuée en présence d'immunoglobulines neutralisantes (152). Chez l'Homme, lors de la séroconversion maternelle à HCMV, l'avidité des anticorps pour le virus est faible. Cette faible affinité des immunoglobulines pour le virus faciliterait le passage transplacentaire du virus lors de primo infection à HCMV (197). Ainsi, dans une étude, une réponse d'anticorps précoce et forte contre les protéines du pentamère gH/gL/pUL128-130-131 était significativement associée à une diminution du risque de transmission du HCMV au fœtus (198). Le transfert des anticorps de la mère au fœtus induirait une protection fœtale contre le virus (199).

C'est l'ensemble de ces données qui justifie l'utilisation d'immunoglobulines hyper-immunes dans le but de prévenir la transmission du virus au fœtus lors d'une primo-infection maternelle.

3. Les cytokines et chimiokines

De nombreuses cytokines peuvent intervenir lors de l'infection congénitale à HCMV. Certaines vont protéger contre l'infection à CMV mais d'autres pourront être susceptibles d'accroître la morbidité de l'infection. Ainsi le profil cytokinique pourrait influencer sur l'environnement fœtal lors de l'infection congénitale et est intéressant à étudier. Une étude a comparé les profils cytokiniques sanguins de nouveau-nés infectés à ceux de leur mère, et a rapporté une augmentation significative du taux d'IL-8 chez les nouveau-nés (200). Une autre étude a comparé le profil cytokinique dans le liquide amniotique chez des fœtus infectés par le HCMV à celui de fœtus non infectés. Les chimiokines CCL2, CCL4 et CXCL10 étaient significativement plus élevées dans les liquides amniotiques infectés témoignant que l'infection à HCMV induit un profil Th1 qui pourrait avoir un effet négatif sur le développement placentaire. Cette étude révèle aussi une augmentation significative des interleukines pro et anti-inflammatoires (IL-10, IL-15, IL-12 et IL-17) dans les liquides amniotiques infectés par le HCMV (175). L'environnement cytokinique dans les organes fœtaux n'a pas jusqu'à lors été étudié.

IV. Le cerveau fœtal

1. Le neurodéveloppement

Le développement du Système Nerveux Central (SNC) humain commence à la troisième semaine du développement embryonnaire quand un mince feuillet de cellules ectodermiques prolifère rapidement pour former la plaque neurale, qui se ferme en tube vers le 30^{ème} jour embryonnaire (201,202). Dans la partie antérieure du tube vont se former les différentes régions du cerveau primitif à partir de trois vésicules primaires : le prosencéphale, le mésencéphale et le rhombencéphale (202). La lumière du tube forme le système ventriculaire entouré de cellules neuro-épithéliales. Dès la fin de la période embryonnaire (8 semaines de développement embryonnaire), les différents compartiments du SNC sont définis (203). Les vésicules télencéphaliques bourgeonnent des deux côtés du prosencéphale et donnent naissance aux hémisphères cérébraux. Le mésencéphale et le rhombencéphale donnent le tronc cérébral et le cervelet. La morphologie des hémisphères cérébraux évolue rapidement avec la neurogenèse qui comprend les étapes de multiplication, de migration et de maturation des neurones. La multiplication cellulaire survient au niveau du neuro-épithélium qui occupe la région ventriculaire. La prolifération des cellules souches est à son apogée vers 3-4 mois de

gestation. Les cellules souches (des régions ventriculaire et sous ventriculaire) sont des progéniteurs des populations gliales, neuronales et de la glia radiaire à l'origine du système de guidage des neurones (201,203–207). *Figure 10 et 11.*

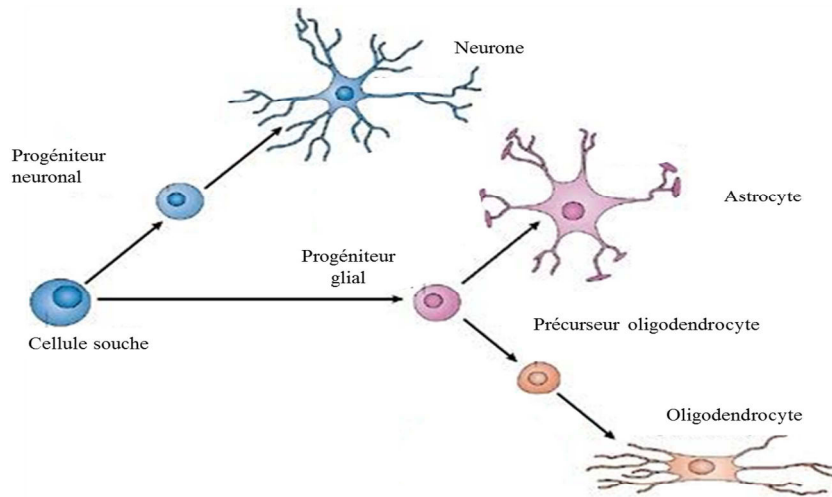


Figure 10 : Neurogenèse et gliogenèse d'après Louvi A et al. 2006 (208).

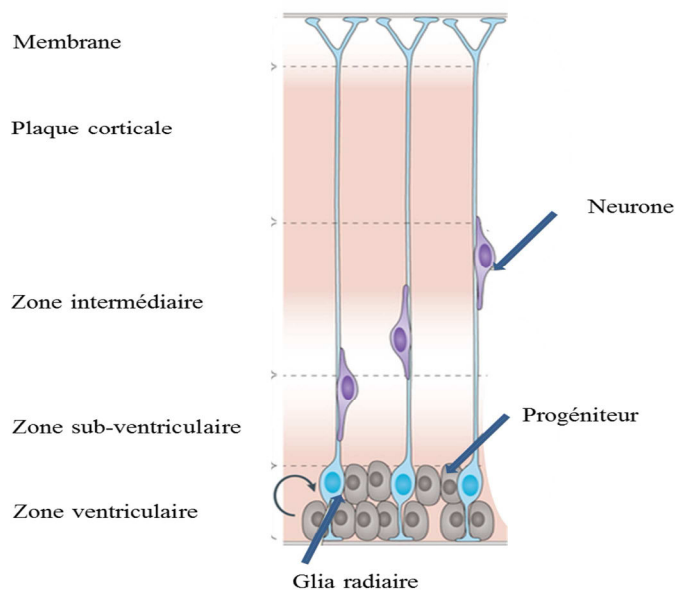


Figure 11 : Migration neuronale via la glia radiaire de la zone ventriculaire au cortex cérébral d'après Maccarone M, 2014 (209).

Avec la multiplication cellulaire, le neuro-épithélium s'épaissit tout autour du réseau ventriculaire et la migration neuronale s'effectue selon un rythme temporo-spatial particulier assurant la mise en place, de dedans en dehors, des six couches du cortex cérébral (210,211). La prolifération et la migration neuronale s'effectuent entre le 2^{ème} mois et le 5^{ème} mois de grossesse. L'interconnexion neuronale fait suite à la phase de migration et débute au 5^{ème} mois de grossesse. La synaptogenèse est l'étape de l'alignement des cellules, de l'orientation puis de la superposition des neurones corticaux, qui est suivie par une excroissance de dendrites et des axones. La maturation du développement cérébral correspond à la myélinisation qui se poursuit après la naissance (207,212). *Figure 12.*

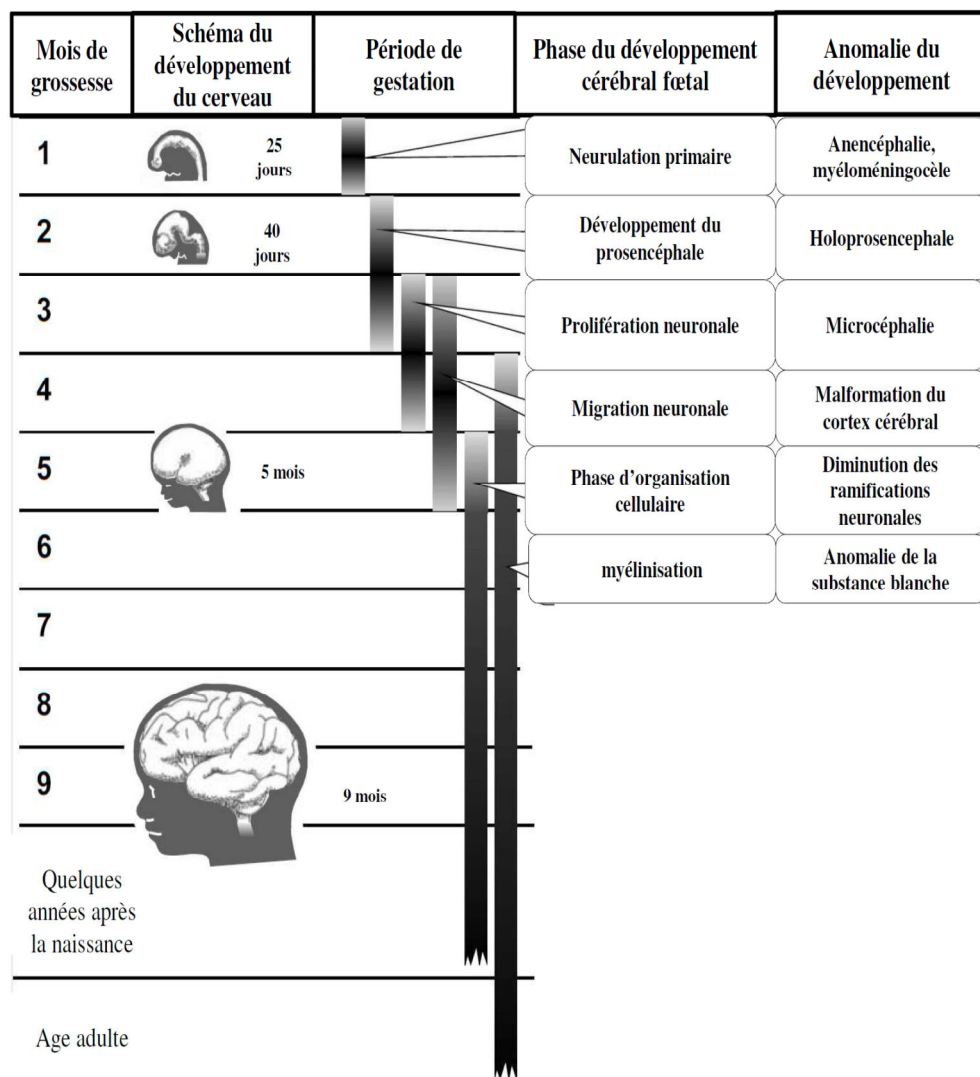


Figure 12 : Développement physiologique du cerveau fœtal en fonction de l'âge de la grossesse et anomalies du développement cérébral correspondant à ces différentes phases de développement. Schéma tiré de la thèse d'Engman ML, 2010 (207).

2. Les marqueurs des cellules du cerveau humain

Beaucoup d'études ont été menées à partir du cerveau humain adulte notamment pour identifier les marqueurs et la localisation des différentes populations cellulaires (195–197,197,198). Les études sur le cerveau en développement sont rares et portent principalement sur l'identification des cellules souches des progéniteurs des neuroblastes et des populations gliales en développement.

La nestine est une protéine du cytosquelette exprimée par les cellules souches neuronales et les progénitrices des neurones durant le développement du système nerveux central et est communément utilisée comme marqueur de ces cellules (217–220). Les cellules souches neuronales nestine+ sont présentes dans les différentes zones du cerveau fœtal humain entre 16 et 36 semaines de grossesse, avec une proportion décroissante dans l'ordre suivant : hippocampe, zone sub-ventriculaire, striatum, lobe frontal, temporal, pariétal et occipital. La quantité de cellules souches neuronales diminue avec l'âge de la grossesse mais les proportions en fonction des zones du cerveau restent stables (221).

La β III tubuline également appelée Tuj1 est une protéine spécifiquement exprimée par les neurones immatures aussi bien chez les animaux (souris, macaque...) que chez l'Homme (215,222–225). Cette protéine serait exprimée dès 10 Semaines d'Aménorrhée (SA) dans le cerveau des fœtus humains et ce jusqu'à terme (226).

La GFAP (Glial Fibrillary Acidic Protein) est considérée comme un marqueur spécifique des astrocytes et est utilisée pour l'identification de ces populations cellulaires *in vivo et in vitro* (227–231). Jusqu'à 18 SA, la GFAP ne serait pas exprimée dans le cerveau fœtal humain. Elle serait exprimée par les cellules astrocytaires et les progéniteurs des cellules gliales de 18 SA jusqu'au terme. La vimentine est un autre marqueur exprimé spécifiquement par les astrocytes (226).

Cependant, le marquage de ces populations cellulaires pourrait ne pas être complètement spécifique. En effet, des études montrent que certaines populations peuvent exprimer des co-marquages : par exemple les cellules progénitrices neuronales peuvent exprimer à la fois la nestine et la β III tubuline et les progéniteurs des cellules gliales peuvent aussi co-exprimer la nestine et la GFAP (219,226,232,233). Par ailleurs, la glie radiaire qui permet la migration des cellules des zones péri-ventriculaires jusqu'au cortex cérébral co-exprimerait le GFAP et la nestine (226,233). De plus deux études ont montré *in vitro et ex vivo* (dans des cerveaux de fœtus humain entre 16 et 20 SA) que certaines cellules exprimaient à la fois la nestine+, la

β III tubuline+ et la GFAP+ : ces cellules seraient présentes dans les zones péri-ventriculaires, corticale et dans la capsule interne. Ces cellules appelées Normal Human Astrocytes (NHA) seraient une population multipotente pouvant se différencier en lignée neuronale (nestine+, β III tubuline+, GFAP-) et en lignée gliale (nestine+, β III tubuline-, GFAP+) (232,233).

Figure 13.

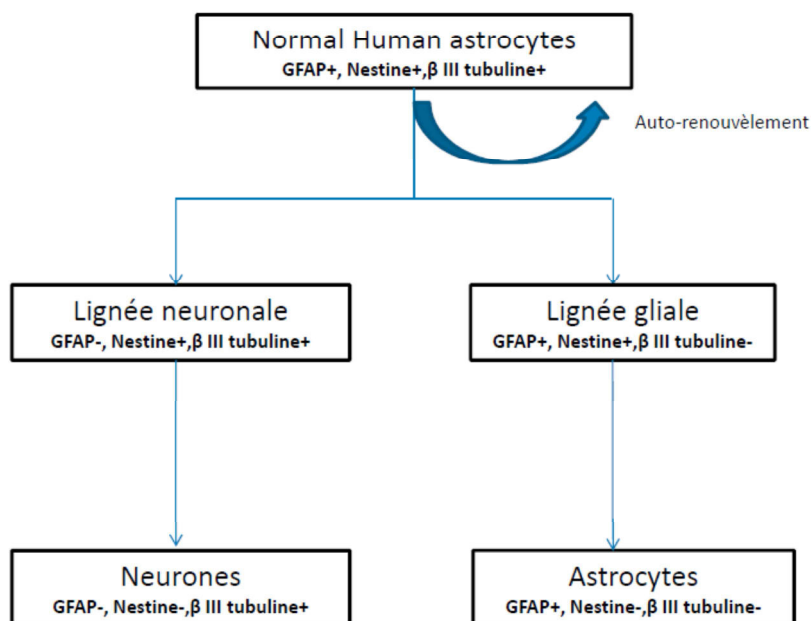


Figure 13 : Marqueurs des cellules du cerveau en fonction de la gliogenèse et de la neurogenèse, d'après Rieske et al.2007 (232).

La barrière hémato-encéphalique chez l'adulte et chez le fœtus est constituée d'astrocytes, de péricytes et de cellules endothéliales (234–238). Les péricytes expriment le NG2 (N-glycan), l' α SMA (alpha Smooth Muscle Actin) et le PDGFR β (Platelet-Derived Growth Factor Receptor) (228,239–243). Le PDGFR α étant exprimé par les oligodendrocytes (239,244,245). Les cellules endothéliales expriment la VE-cadhérine (Vascular Endothelial cadherin) qui est une protéine de jonction que l'on retrouve au niveau de la barrière hémato-encéphalique mais ces cellules expriment également le VEGFR (Vascular Endothelial Growth Factor Receptor) (228,246–250). La synthèse des marqueurs antigéniques des lignées cellulaires du cerveau fœtal humain est présentée *tableau 1*.

Tableau 1 : Synthèse des marqueurs antigéniques des lignées cellulaires du cerveau fœtal humain

	GFAP	Vimentine	Nestine	β III Tubuline	VEGFR-2	Ve-cadherine	NG2	SMA	PDGFR α	PDGFR β
Astrocytes immatures	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-
Astrocytes matures	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Neurones	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-
Oligodendrocytes	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-
Cellules souches neurales	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-
Cellules endothéliales	-	-	-	-	+	+	-	-	-	-
Péricytes	-	-	-	-	-	-	+	+	-	+
Progéniteurs des neurones	-	-	+	+	-	-	-	-	-	-

3. Infection à HCMV et anomalies cérébrales

Les anomalies cérébrales fœtales constatées lors de l'infection à CMV suggèrent que cette infection interfère avec le développement normal du cerveau. En effet, la microencéphalie est le résultat d'un défaut de prolifération des neurones. Les troubles de la gyration comme une lissencéphalie ou une polymicrogyrie sont liés à un défaut de migration neuronale. Un lien est clairement établi en clinique entre l'infection congénitale à HCMV et ces anomalies cérébrales fœtales. En fonction de l'extension et de la localisation des dommages du développement du cerveau fœtal, il pourra se développer des séquelles neurologiques telles que des retards mentaux, des troubles auditifs, des épilepsies... (205,207,251,252).

Lors de l'examen neuropathologique, à l'échelle microscopique, 4 lésions élémentaires ont été décrites : des foyers de nécrose, des calcifications, des tableaux de ventriculoencéphalite (destruction du revêtement épendymaire) avec ventriculomégalie et des micropolygyries.

Cependant la physiopathologie précise de l'atteinte cérébrale fœtale est encore mal connue. Notamment les parts respectives du virus et de la réaction immunitaire locale ont été peu étudiées.

4. Tropisme du HCMV pour les cellules cérébrales

Le tropisme du HCMV pour les composantes cellulaires du SNC n'est pas complètement élucidé (253).

Des études *in vitro* de culture cellulaire humaine mettent en évidence un tropisme étendu du HCMV. En effet, les cellules endothéliales, les astrocytes, les neurones, les oligodendrocytes, les macrophages, les cellules progénitrices des neurones et les cellules souches seraient toutes

permissives au HCMV (253–260). En revanche, une étude montre que les cellules de la microglie ne seraient pas permissives à la réplication virale (255). Cependant, les cellules cérébrales n'ont pas toutes la même permissivité au virus, ne permettant pas le même niveau de réplication virale (253,254). Une multiplication virale a été mise en évidence dans les astrocytes en culture cellulaire (259,261) tandis que les oligodendrocytes ne seraient pas pleinement permissifs au HCMV (257). Les neurones infectés ne semblent pas répliquer le virus alors que dans les cellules précurseurs des neurones et les cellules souches la réplication est importante (259,262,263). Le virus pourrait par ailleurs, bloquer la différenciation des cellules souches en astrocytes et en neurones (264,265) et pourrait induire l'apoptose des cellules souches neurales (220,264,265).

Une seule étude en immuno-histochimie a été réalisée sur des cerveaux de fœtus humains entre 23 et 28 SA infectés par le HCMV et a permis de montrer par des doubles marquages un tropisme décroissant du virus pour les cellules astrocytaires, les cellules nestines positives (cellules souches mais également les cellules précurseurs neuronales et gliales), les cellules endothéliales, les macrophages et dans une moindre mesure les neurones. Dans cette étude *ex vivo* les péricytes n'ont pas révélé de double marquage avec le HCMV, alors que dans une autre étude *in vitro* le HCMV se multipliait dans des péricytes en culture (266,267).

Chez l'animal, le tropisme du CMV pour les cellules cérébrales a été étudié préférentiellement dans le modèle murin. Dans ce modèle, la réplication du MCMV est préférentiellement retrouvée dans les astrocytes (268,269). Cependant, le virus inhiberait aussi la différenciation des cellules souches en cellules neuronales (270). Ces cellules souches neurales ainsi que les cellules progénitrices des neurones seraient permissives au MCMV et leur quantité diminuerait au cours de l'infection. (271).

5. Réaction immunitaire dans le cerveau fœtal

a. Réponse immunitaire innée

La réponse innée est la première ligne de défense lors d'une infection cérébrale, elle comprend l'activation des macrophages, des NK et des cytokines (272). Une étude menée chez les souris nouveau-nées infectées par injection intracérébrale du MCMV, montre un phénomène évolutif dans l'infection neurale. En effet, le virus est d'abord retrouvé dans les régions péri-ventriculaires à J3 post infection, puis au niveau de l'hippocampe. Les antigènes viraux disparaissent de la zone péri-ventriculaire autour de J10 post infection. Les cellules NK et les macrophages présents dans la zone péri-ventriculaire ont un marquage positif aux

antigènes du MCMV, ce qui suggère que ces cellules joueraient un rôle important dans l'élimination du virus dans la zone péri-ventriculaire (272). Une étude menée chez le fœtus humain, en dehors d'une infection à HCMV mais dans un contexte d'inflammation cérébrale (au 2^{ème} trimestre de grossesse) provoquée soit par un traumatisme, soit par une maladie auto-immune, montre la présence de NK activés (NKp46) par technique de cytométrie de flux (273). Aucune étude, à notre connaissance, n'a été menée sur la présence des NKp46 ni des NKG2C+ dans des cerveaux fœtaux humains infectés par le HCMV.

b. Réponse immunitaire adaptative

La réponse lymphocytaire T. Une étude menée chez les souris femelles à 6-8 SA, après injection intra-ventriculaire du MCMV, montre une augmentation significative des cellules T CD8 dès J5 mais aussi à J30 post infection alors que les T CD4 semblent rester stables au cours du temps. De plus, la population des T CD8 semble être dominante dans les cerveaux des souris infectées puisqu'elle représente 70% des T CD3 à J30 post-infection. Cette étude suggère un rôle clé des lymphocytes T CD8 dans le contrôle de la phase aigüe de l'infection cérébrale à MCMV mais également dans la persistance de ces cellules dans le cerveau des souris, même en absence de réplication virale active (271). Une autre étude a également été réalisée dans les cerveaux de souris qui avaient été infectées en période néonatale (6-18 heures en post-partum) par le MCMV, par injection intrapéritonéale. Les souris avaient un taux de virus indétectable dans le cerveau à J21 du post-partum. En revanche, les souris déplétées en lymphocytes T CD8 mourraient à J15 du post-partum et la charge virale MCMV était augmentée dans les différents organes comme le foie, la rate et le système nerveux central, ce qui suggère un rôle crucial de ces cellules dans le contrôle de la réplication virale dans les cerveaux des souriceaux nouveau-nés (274).

Dans le cerveau des fœtus humains, une étude de 2012, portant sur 45 fœtus entre 20 et 21 SA issues d'IMG pour séroconversion HCMV avec anomalie cérébrale a été réalisée par des méthodes d'immunohistochimie (275). Il a été observé un lien entre une réplication virale élevée dans le cerveau fœtal et la sévérité de l'atteinte cérébrale. Par ailleurs, dans cette étude, l'infiltration par les lymphocytes T CD8 était prédominante et ces cellules étaient détectées dans l'ensemble du parenchyme cérébral et associées à la présence de granzyme B (marqueur de la cytotoxicité des cellules effectrices). En revanche, les taux de T CD4 et de CD20 étaient bas et souvent proches de ceux obtenus chez les témoins. Une étude publiée en 2014 (266), portant sur 16 échantillons de cerveaux de fœtus infectés par le HCMV entre 23 et 28 SA a mis en évidence par immunohistochimie une répartition diffuse des T CD8 dans le

parenchyme cérébral ainsi que la présence de granzyme B. La majorité des lymphocytes T CD3+ était des lymphocytes T CD8. Les plasmocytes étaient également détectés mais en quantité moins importante que les CD8. A notre connaissance, aucune autre étude n'a été réalisée sur la présence de plasmocytes dans les cerveaux fœtaux humains infectés par le HCMV.

La réponse lymphocytaire B a été peu étudiée. Dans une étude de 2012, des souris femelles âgées de 6-8 semaines ont subi une injection de MCMV en intraventriculaire. A 7 jours post infection, les ARNm des facteurs d'activation des lymphocytes B et des facteurs de prolifération des plasmocytes étaient présents. Ces ARNm étaient également retrouvés dans les cerveaux des souris à J30 post infection. L'interleukine 21, impliquée dans la prolifération des lymphocytes B et la différenciation en plasmocytes était également présente et à des taux élevés à J7 post infection. La présence des plasmocytes (CD45+, CD3-, CD138+, CD38+) a ensuite été mise en évidence par cytométrie de flux et par immunofluorescence. La présence de plasmocytes était retrouvée à J7 post infection et déclinait au cours du temps de l'étude (14, 21, 30 jours après l'infection). Ils étaient localisés préférentiellement dans les zones ventriculaires et au niveau du cortex cérébral. La présence des plasmocytes a été confirmée par immunohistochimie (CD138) à J30 mais également à J65 post-infection. La présence d'IgM et IgG était également positive et colocalisée (avec les plasmocytes) dans les zones péri-ventriculaires. Cette étude démontre que les lymphocytes B semblent être recrutés tôt dans le système nerveux central après une infection virale et persistent durant les phases de latence. Le rôle des lymphocytes B et des plasmocytes dans la lutte contre l'infection à MCMV semble établi dans les organes tels que les poumons, la rate ou les glandes salivaires mais le rôle de ces cellules dans le cerveau n'est pas encore clair (276). En revanche la production d'anticorps dans les cerveaux des souris infectées en période néonatale diminuerait les altérations morphologiques causées par le virus (277).

c. Cytokines dans le cerveau

Les cytokines ont un rôle essentiel pour la maturation du cerveau fœtal (278). Les cytokines impliquées dans l'inflammation peuvent avoir à la fois un rôle positif mais également un rôle négatif sur la différenciation et la prolifération neuronale (279). Il a aussi été mis en évidence que lors d'une inflammation dans le cerveau humain, les cytokines influençaient la régulation de la prolifération et la neurogenèse (280,281).

Une revue reprenant l'ensemble des données disponibles chez l'animal, chez l'homme et *in vitro*, suggère que les cytokines pourraient avoir des effets différents selon les espèces et pourraient avoir un impact aussi bien sur la lignée neuronale que sur la lignée gliale (279). Cependant, les résultats des études peuvent être divergents en fonction des types cellulaires, en fonction de l'animal ou de l'homme (282–289).

L'IL-1 β favoriserait la neurogenèse chez les fœtus rats alors qu'elle réduirait l'apoptose dans les cellules de rat adulte (284). Chez le fœtus humain, cette interleukine inhiberait la neurogenèse et l'astroglionèse dans l'hippocampe (290,291) ainsi que la différenciation neuronale, alors qu'elle augmenterait dans le même temps la prolifération neuronale au niveau des zones sub-germinatives (292).

Le TNF α augmenterait la gliogenèse mais diminuerait la neurogenèse dans les cellules fœtales humaines, chez le rat adulte et chez les souris en période néonatale (290,293–297). Lorsque *in vitro* on administre du TNF α (couplé à de l'IFN γ) on observe une augmentation de la migration neuronale dans le modèle murin (298).

Les IFN γ augmenterait la neurogenèse et la gliogenèse dans les cellules du cerveau fœtal humain, de rat et de souris (288,289,299–301).

L'IL-6, dans de nombreuses études, réduit la prolifération et la gliogenèse mais augmente la différenciation neuronale, mais ceci dépend du type de cellules et de leur âge (302,303). En effet, chez les fœtus humains et chez les fœtus de rat, il augmenterait la neurogenèse (dans les niches neurogéniques) alors qu'il la diminuerait chez le rat adulte (293,296,303).

L'IL-4 réduirait la prolifération et augmenterait la différenciation neuronale et gliale (287,304).

L'IL-10 augmenterait la prolifération mais réduirait la différenciation neuronale et gliale chez la souris *in vitro*. Chez les souris adultes *in vivo*, le traitement de cerveau avec de l'IL-10 provoque un affaiblissement de la neurogenèse (dans des niches neurogéniques) et l'absence d'IL-10 induit une augmentation de la différenciation neuronale des cellules progénitrices (305).

Au total, la neurogenèse est donc favorisée par l'IL-1 α , IL-4, l'IFN γ et l'IL-6 mais serait inhibée par la présence d'IL-1 β , d'IL-10 et de TNF α . La **gliogenèse** est favorisée par l'IL-4, l'IFN γ , le TNF α et l'IL-1 β et indifférente à la présence d'IL-10 et d'IL-6. **La**

prolifération cellulaire est augmentée par l'IL-10 et le TNF α et parfois par l'IL-1 β (diminution chez le rat, augmentation chez l'homme) et diminuée par l'IL-4 et par l'IFN γ et α . La migration cellulaire est influencée positivement par l'association de l'IFN γ et du TNF α . L'apoptose des cellules cérébrales est augmentée par la présence d'IFN γ et de TNF α et est diminuée en présence d'IL-4 et d'IL-10.

On comprend donc bien l'importance d'une balance, d'un équilibre dans la synthèse de ces différentes molécules afin de préserver une prolifération, une différenciation, une neurogenèse et une gliogenèse harmonieuses. Une infection pourrait déstabiliser cet équilibre et provoquer un excès ou un défaut de certaines de ces molécules perturbant ainsi les différentes étapes de la neurogenèse, gliogenèse et provoquer une apoptose non physiologique.

V. Rôle de PPAR γ

1. Généralités

PPAR γ (Peroxisome Proliferator Receptor) est un facteur de transcription cellulaire de la famille des récepteurs nucléaires. Il existe 3 isotypes de PPAR : alpha (α), gamma (γ) et beta/delta (β/δ) (306). Différents types d'acides gras dont les acides gras insaturés (acides arachidonique, linoléique...) et les éicosanoïdes (prostaglandines, leucotriènes ...) peuvent se fixer aux PPARs et les activer. Les hétérodimères PPAR /RXR (Retinoid X Receptor) se lient à l'ADN sur des éléments de réponse appelés PPRE (PPAR Response Element) présents dans les régions régulatrices des gènes cibles (306). Outre les acides gras insaturés et dérivés, il existe également des ligands de synthèse activateurs de PPAR γ comme la rosiglitazone, la troglitazone, ciglitazone ... qui sont des molécules utilisées dans le traitement du diabète de type II (307). PPAR γ joue un rôle physiologique dans le métabolisme des lipides (adipogénèse) et dans la diminution de la résistance à l'insuline (308,309).

PPAR γ a aussi un rôle immuno-modulateur (310–312). Il est présent dans les cellules dendritiques, macrophages, lymphocytes T, B et NK (312) .

Une étude menée chez la souris montre qu'en diminuant ou en bloquant le métabolisme des lipides, PPAR γ empêche la maturation des cellules dendritiques ce qui a pour conséquence une immunotolérance de ces cellules immunitaires (313). Il a également été montré, *in vitro*, que l'activation du PPAR γ sur les cellules dendritiques diminue la sécrétion d'IL-12, de certains récepteurs (CD80) et régule des chimiokines impliquées dans les réponses Th1 (314).

Dans les macrophages, PPAR γ joue un rôle important dans l'homéostasie des lipides. Dans le modèle murin, un lien est établi entre PPAR γ , les macrophages et l'athérosclérose (provoquée par une hyperlipidémie et une inflammation des vaisseaux sanguins) (312). PPAR γ est également détecté dans les lymphocytes à l'état physiologique. Chez la souris, les agonistes de PPAR γ , inhibent la prolifération des cellules T, diminuent leur viabilité et induisent l'apoptose. Cependant il a également été montré qu'à de faibles doses (0,5 μ M pour le rosiglitazone ou 10 μ M avec le ciglitazone) PPAR γ protégerait les lymphocytes de l'apoptose (315). PPAR γ inhibe la production de cytokines pro-inflammatoires (IL-8, IFN α , TNF β) par les lymphocytes T et induit la sécrétion de cytokines anti-inflammatoires comme l'IL-10. L'agoniste de PPAR γ induit également l'apoptose des lymphocytes B (316). Il permet par ailleurs de réguler la sécrétion d'IL-2 par les cellules NK et inhibe l'expression de l'IFN, cependant l'inhibition de l'activité cytotoxique des NK serait indépendante de l'activité du PPAR γ (312). L'action anti-inflammatoire de PPAR γ va également s'exprimer dans les cellules endothéliales et épithéliales en diminuant l'expression de cytokines et de chimiokines (317). *Figure 14.*

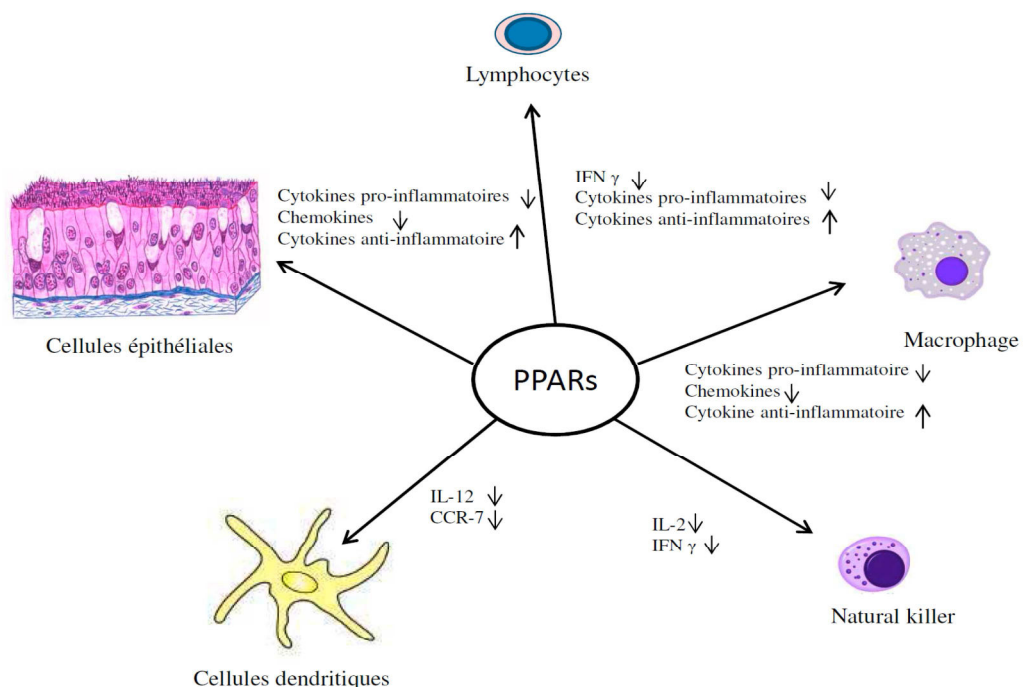


Figure 14 : Rôle des PPARs dans l'inflammation. Les PPARs influencent la réponse des cellules immunitaires soit en augmentant soit en diminuant certaines interleukines et chimiokines (312,313,317).

2. PPAR γ dans le placenta

De façon physiologique, il a été décrit que PPAR γ est exprimé dans le placenta humain et particulièrement dans le trophoblaste. Chez la souris homozygote PPAR $\gamma^{-/-}$ l'on observe 100% de décès des embryons homozygotes suite à un défaut de différenciation et de développement du trophoblaste (318). PPAR γ joue un rôle clé dans la différenciation, l'invasion et la migration du trophoblaste lors de la placentation chez l'Homme (306,319–321). PPAR γ serait essentiel pour réguler l'accumulation des graisses dans le trophoblaste et le transport des acides gras du placenta au fœtus (322). Il a également été observé dans des pathologies gravidiques comme le diabète gestationnel que l'expression de PPAR γ était augmentée dans les placentas dans les modèles animaux. Le traitement par un antagoniste du PPAR γ (T0070907) chez les rats en gestation provoquait une élévation de la pression artérielle, une protéinurie et une thrombopénie qui sont des signes évocateurs d'une pré-éclampsie (323,324). Une étude a également mis en évidence une expression significativement plus importante de PPAR γ dans les placentas hypotrophes et chez les nouveau-nés de petit poids de naissance (325). *Figure 15.*

Lors d'une infection à HCMV, l'activité du PPAR γ augmente considérablement dans les cellules du trophoblaste. L'activité de cette protéine est détournée au profit de la réplication virale. En effet, PPAR γ se fixe sur les PPRE (PPAR Response Element) du promoteur viral MIEP et transactive l'expression des gènes IE (306).

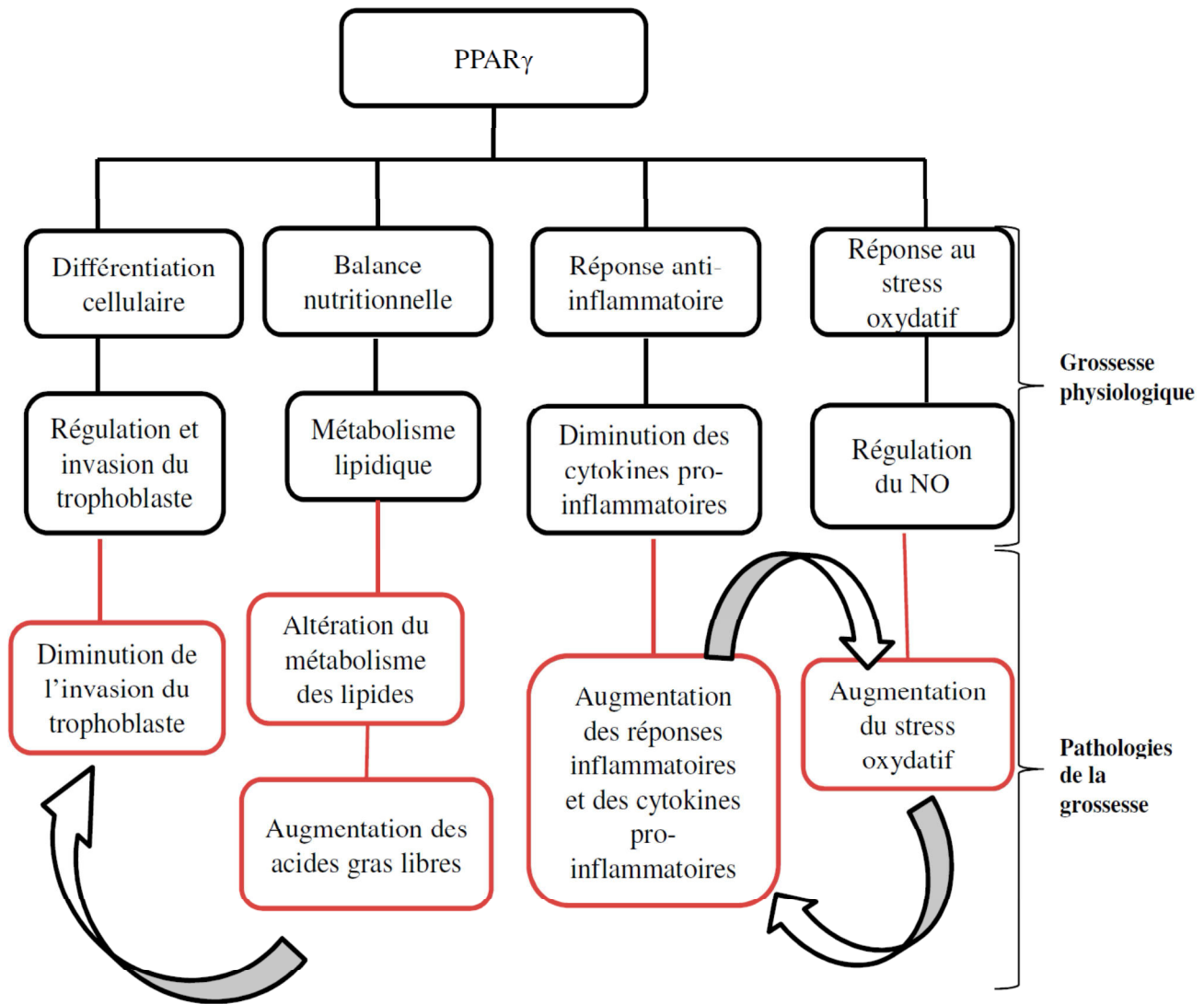


Figure 15 : Rôle du PPAR γ dans la grossesse physiologique et lors de pathologies gravidiques d'après Kadam et al. 2015 (326).

3. PPAR γ dans le cerveau

Dans le cerveau, l'expression des PPAR a également été décrite (327–330). Chez les souris, l'inactivation des gènes des PPAR déstabilise l'homéostasie de différents organes et provoque des dysfonctionnements neuronaux (327,331,332). Toujours chez les souris, PPAR γ avait une expression plus élevée dans les cerveaux d'embryon que dans les cerveaux de souris adultes.

Par ailleurs, il a été montré que les souris homozygotes PPAR $\gamma^{-/-}$ et hétérozygotes PPAR $\gamma^{-/+}$ avaient des anomalies du développement du système nerveux central des souris en particulier durant l'embryogénèse précoce (328).

PPAR γ joue un rôle dans la prolifération et la différenciation des cellules souches neurales et des progéniteurs neuronaux. Dans une étude de 2006, le traitement par un agoniste (Rosiglitazone) du PPAR γ chez la souris stimule la prolifération des cellules souches neurales mais inhibe la différenciation de ces cellules en neurone (328).

Une étude de 2012, s'est intéressée à l'expression des marqueurs des cellules du cerveau : Nestine (cellule souche neurale), GFAP (astrocyte et progéniteurs neuronaux), map2 (microtubuline-associated protein 2) et β III tubuline (neurone). L'expression de la nestine, de GFAP et de map2 n'était pas influencée par un agoniste du PPAR γ . Au contraire un traitement par un antagoniste du PPAR γ diminuait de façon significative l'expression des marqueurs spécifiques des cellules souches neurales, des astrocytes et des neurones (333). Ce qui suggère que PPAR γ aurait un rôle dans la gliogénèse et dans la neurogénèse.

On comprend au vu des connaissances du PPAR γ qu'il existe une fine balance physiologique entre l'activation et l'inhibition du PPAR γ dans la prolifération et la différenciation des cellules du cerveau (330).

OBJECTIFS

L'infection materno-fœtale à cytomégalovirus (CMV) représente la première cause d'infection congénitale virale et la première cause de handicap neurologique congénital d'origine infectieuse. Bien que de nombreuses connaissances soient maintenant disponibles sur cette infection, certains aspects de la prise en charge restent peu consensuels et la physiopathologie de l'infection, notamment celle de l'atteinte du cerveau fœtal, reste mal élucidée. La validation de marqueurs fiables pour évaluer le risque de transmission du virus au fœtus lors de l'infection maternelle et pour évaluer avec précision le pronostic en cas d'infection fœtale serait cruciale pour une prise en charge optimisée de l'infection *in utero*. Par ailleurs très peu d'études se sont attachées à analyser les corrélats immuno-virologiques de l'atteinte du cerveau fœtal *in vivo* directement à partir d'échantillons de tissus cérébraux provenant de fœtus infectés. Il n'y a notamment pas de connaissance sur la réponse immune innée au niveau du tissu cérébral fœtal et sur les aspects qualitatifs de la réponse cellulaire adaptative.

L'EA 7328 est une équipe d'accueil qui regroupe un ensemble de cliniciens chercheurs de l'hôpital Necker Enfants-Malades très investis dans la prise en charge de l'infection congénitale à CMV dans ses aspects cliniques anténataux et pédiatriques mais aussi ses aspects biologiques avec le laboratoire de virologie associé au centre national de référence CMV. A l'occasion de différents projets de recherche (Cymeguthrie Fondation de L'Avenir 2006 CPP-2007-A0044-49, Cymeval PHRC 2008 CPP 2011-001610-34, Cymepedia PHRC 2012, 2013-A00123-42) une collection biologique comprenant des échantillons de sérum de femmes enceintes, de liquides amniotiques, d'urines, de salives et de sangs de nouveau-né, de sangs fœtal, de biopsies placentaires et cérébrales congelées ou incluses en paraffine a été constituée. En cas d'interruption médicale de grossesse, nous avons obtenu l'autorisation de prélèvement de tissus fœtaux pour cette recherche auprès de l'Agence de Biomédecine (PFS-15-009).

Les objectifs de la première partie de ce travail étaient 1) de modéliser le risque de transmission du CMV au fœtus en cas de primo-infection maternelle à partir des données du

bilan virologique maternel (taux d'immunoglobulines anti-CMV, maturation des IgG et virémie maternelle) 2) d'évaluer l'apport de la mesure de la charge virale dans le sang fœtal et dans le liquide amniotique dans le cadre du bilan pronostique d'une infection fœtale diagnostiquée au 2^{ème} trimestre de la grossesse.

Les objectifs de la deuxième partie de ce travail étaient d'évaluer le lien entre la sévérité de l'atteinte cérébrale fœtale telle qu'objectivée à l'examen anatomo-pathologique, le niveau de la multiplication virale dans le cerveau fœtal et les réactions immunes innée et adaptative (CD8, CD3, CD20, NK et plasmocytaires) et de PPAR γ .

Article 1

Prédiction de l'infection fœtale à cytomégalovirus en cas de sérologie avec des immunoglobulines M positives au premier trimestre de la grossesse : une cohorte rétrospective

Lorsque les IgM CMV sont positives au 1^{er} trimestre de la grossesse, l'état de l'art est de mesurer l'index d'avidité des IgG CMV afin d'exclure ou non la survenue d'une primo-infection pendant la grossesse. En cas de primo-infection au 1^{er} trimestre le risque théorique de transmission du CMV au fœtus a été évalué autour de 40%. Il nous est apparu intéressant d'essayer d'évaluer plus précisément ce risque en fonction de chaque cas. En effet, une évaluation plus fine du risque de transmission faciliterait le conseil prénatal notamment sur le choix d'une amniocentèse à visée diagnostic et permettrait également d'identifier une population à haut risque de transmission qui pourrait dans le futur bénéficier d'un traitement prénatal adapté (131,140).

L'objectif de cette étude était de modéliser, en cas de primo-infection maternelle certaine ou probable au 1^{er} trimestre, le risque de transmission de la mère au fœtus à partir des éléments du bilan virologique maternel classique (taux d'IgG, taux d'IgM, avidité des IgG et présence ou non d'ADN CMV dans le sérum maternel).

Méthode : Dans cette étude les informations concernant l'infection congénitale à CMV, les risques de transmission et la prévention primaire ont été expliquées à la première consultation de grossesse entre 11 et 13 semaines d'aménorrhée. Si les patientes donnaient leur accord écrit une sérologie CMV était réalisée avec mesure des IgG et des IgM avec les techniques de routine du laboratoire soit avec les tests Liaison Diasorin®. Lorsque les IgM étaient positives ou dans la zone grise de la technique, l'index d'avidité des IgG était réalisé par 2 techniques en parallèle (CMV avidity VIDAS® et CMV avidity LIAISON®). Une avidité des IgG CMV faible est compatible avec une primo-infection de moins de 3 mois, alors qu'une avidité élevée exclut une infection de moins de 3 mois. Lorsque l'index d'avidité des IgG était faible ou modéré, une amniocentèse à 21 SA était proposée pour réaliser une PCR CMV sur le liquide amniotique.

Population : Entre 2009 et 2011, 4931 femmes vues pour leur première consultation de grossesse à l'hôpital Necker Enfants-Malades ont eu une sérologie CMV. Parmi cette cohorte rétrospective, 2038 femmes avaient une sérologie CMV négative (IgM et IgG négatives), 2692 femmes avaient des IgG positives sans IgM détectables et 201 avaient des IgG positives

et des IgM positives ou équivoques. Parmi ces 201 cas, l'index d'avidité était faible ou équivoque dans 83 cas (41%). L'infection congénitale a été recherchée en réalisant une PCR CMV dans le liquide amniotique et ou dans les urines du nouveau-né dans 72 de ces 83 cas. La transmission au fœtus était survenue dans 17 cas (24%). Le taux de transmission était de 36,5% dans le groupe des femmes qui avait une suspicion de primo-infection au premier trimestre de grossesse (femmes qui avaient un faible index d'avidité des IgG) et de 6,4% dans le groupe des femmes dont la suspicion de primo-infection était péri-conceptionnelle (index d'avidité des IgG intermédiaire).

Résultats : Le taux des IgM n'était pas significativement différent entre le groupe des femmes ayant transmis le virus et celui de celles ne l'ayant pas transmis. En revanche les taux d'IgG et ceux des index d'avidité des IgG étaient significativement plus faibles en cas de transmission ($p < 0,001$) et ce, quelle que soit la trousse utilisée. De même, la détection d'ADN CMV dans le sérum maternel était plus souvent positive chez les femmes ayant transmis le virus à leur fœtus que chez celles ne l'ayant pas transmis ($p=0,02$). Lors de l'analyse univariée, tous les paramètres étaient associés à la transmission à l'exception du taux d'IgM. Lors de l'analyse bivariée, une PCR CMV positive dans le sang maternel augmentait le risque de transmission par 12,38 (IC 95% [1,77-86,33]), chaque augmentation du taux d'avidité de 0,1 était associée à une diminution du risque de transmission de 0,16 (IC 95% [0,03-0,95]) et chaque augmentation du taux d'IgG de 1 unité était associée à une diminution de risque de transmission de 0,13 (IC 95% [0,02-0,73]).

La comparaison des valeurs des index d'avidité obtenues avec les 2 trouses commerciales montrait une corrélation correcte $R^2 = 0,667$. Cependant, la concordance entre l'interprétation du résultat en avidité faible, moyenne ou forte était franchement mauvaise à 49,5% et un coefficient kappa de 0,306.

Discussion : Nous avons montré qu'en cas d'IgM positives au 1er trimestre de la grossesse, plus l'index d'avidité des IgG et le taux des IgG maternelles sont faibles plus le risque de transmission du CMV de la mère au fœtus est élevé. Ce risque de transmission verticale est aussi augmenté en cas de PCR CMV positive dans le sérum maternel. Ceci nous a permis de modéliser un algorithme de prédiction de la transmission en fonction de ces paramètres, cet algorithme permet de donner un risque individuel de transmission adapté à chaque patiente. Ce calcul de risque est maintenant utilisé dans notre laboratoire.

Prediction of Fetal Infection in Cases With Cytomegalovirus Immunoglobulin M in the First Trimester of Pregnancy: A Retrospective Cohort

Marianne Leruez-Ville,^{1,2} Yann Sellier,^{1,2,3} Laurent J. Salomon,³ Julien J. Stirnemann,³ François Jacquemard,⁴ and Yves Ville³

¹Laboratory of Virology, Hôpital Necker-Enfants-malades, Assistance Publique–Hôpitaux de Paris (AP-HP)–University Paris Descartes, Sorbonne Paris Cité, ²National Reference Center for Cytomegalovirus-Associated Laboratory, Paris, ³Department of Obstetric and Fetal Medicine, Hôpital Necker-Enfants-malades, AP-HP–University Paris Descartes, and ⁴Obstetric Department, Hospital Poissy, Poissy, France

(See the Editorial Commentary by Pass on pages 1436–7.)

Background. Interpretation of positive cytomegalovirus (CMV) immunoglobulin M (IgM) in the first trimester of pregnancy is ill-defined. We aimed to quantify the risk of fetal transmission in women with positive CMV IgM in the first trimester.

Methods. A retrospective cohort of women (2009–2011) was tested for CMV immunoglobulin G (IgG) and IgM before 14 weeks of gestation. IgG avidity was tested with 2 assays (LIAISON and VIDAS). CMV polymerase chain reaction (PCR) was done in maternal serum, amniotic fluid, or neonatal urine at birth.

Results. A total of 4931 consecutive women were screened; 201 presented with positive or equivocal IgM and with high, intermediate, or low IgG avidity in 58.7%, 18.9%, and 22.3%, respectively. In 72 women with low or intermediate avidity, fetal transmission was 23.6%. In multivariate analysis, positive CMV PCR in maternal serum, decreasing avidity index with both LIAISON and VIDAS, and low IgG titers were all associated with fetal transmission (odds ratio [OR], 12.38 [95% confidence interval {CI}, 1.77–86.33], $P = .011$; OR, 0.16 [95% CI, .03–.95], $P = .044$; OR, 0.54 [95% CI, .11–.88], $P = .028$; and OR, 0.27 [95% CI, .29–.84], $P = .010$, respectively).

Conclusion. This study demonstrates a significant association between the risk of vertical transmission and the avidity index combined with CMV PCR in maternal serum or IgG titers. This allows calculation of incremental risk of fetal transmission upon which informed choice can be based and could lead to a better pickup rate of fetal infection while decreasing unnecessary invasive procedures.

Keywords. cytomegalovirus; CMV IgG avidity; fetal transmission; CMV IgM.

Cytomegalovirus (CMV) infection occurs in 0.7% of live births [1] with 15%–20% of infected children developing long-term disability including hearing loss and cognitive deficit [2]. The most severe cases of congenital CMV infection are the consequence of primary

CMV infection during pregnancy [3, 4]. Accurate identification of primary infection in pregnancy and accurate evaluation of the risk of fetal transmission is important for antenatal management and could also allow for the possibility of prenatal treatment [5, 6].

In our center, information on congenital CMV infection and on the risk of primary infection in pregnancy as well as its prevention is routinely explained at registration in order to follow national recommendations [7]. As a result, women electing to know their serological status are offered immunoglobulin M (IgM) and immunoglobulin G (IgG) assessment. In cases with positive IgM and IgG, the CMV IgG avidity

Received 31 July 2012; accepted 19 November 2012; electronically published 7 February 2013.

Correspondence: Marianne Leruez-Ville, MD, PhD, Hôpital Necker-Enfants-malades, 149 rue de Sèvres, Paris 75015, France (marianne.leruez@nck.aphp.fr).

Clinical Infectious Diseases 2013;56(10):1428–35

© The Author 2013. Published by Oxford University Press on behalf of the Infectious Diseases Society of America. All rights reserved. For Permissions, please e-mail: journals.permissions@oup.com.

DOI: 10.1093/cid/cit059

index is used to discriminate between primary infection during or prior to pregnancy based on the correlation between increased binding avidity of maternal IgG to CMV antigens over time [8–12]. When CMV IgG avidity is low or moderate, the women are classified as having a high suspicion of primary infection and are informed that there is a risk of fetal transmission of 30%–40% [2]. Amniocentesis after 20–21 weeks of gestation and/or fetal ultrasound monitoring are usually recommended in these cases [13, 14]. However, this may lead to patients undergoing unnecessary invasive procedures or even to a decision of termination of pregnancy on the sole basis of a high risk of fetal infection.

We built a retrospective cohort of women who had CMV serology testing in the first trimester of pregnancy in our institution. The main objective of this retrospective study was to identify virological markers that could help to accurately predict the risk of fetal infection in order to better counsel women with primary infection either during or prior to the first trimester of pregnancy and to help them to decide on the need for an invasive procedure.

MATERIALS AND METHODS

Population

The primary exposure variable to enter this retrospective cohort was to have been tested for CMV IgG and IgM at registration in the first trimester of pregnancy between September 2009 and December 2011. We identified the cases through the virology laboratory database. For women presenting with positive or equivocal IgM, the obstetrical file was reviewed to get information on the outcome of pregnancy (antenatal ultrasound data, CMV testing, clinical and imaging evaluation of the baby at birth).

According to French laws, an ethics statement from an institutional review board was not required for this work. However, all women gave written consent for the result of their screening tests to be used anonymously for research purposes. Moreover, all women who had amniocentesis for CMV prenatal diagnosis gave a written consent.

The standardized protocol used for CMV infection screening in our institution is described in Figure 1. One of the specificities of this algorithm is the use of 2 IgG avidity assays in parallel as well as that of CMV polymerase chain reaction (PCR) in maternal serum.

Methods

All laboratory tests were done prospectively but data were analyzed retrospectively.

CMV serology was performed using LIAISON CMV IgG and LIAISON CMV IgM. When IgG was positive (>0.6 IU/mL) and IgM was equivocal (≥ 15 arbitrary units [AU]/mL

and <30 AU/mL) or positive (≥ 30 AU/mL), CMV IgG avidity was tested. The LIAISON CMV IgG Avidity assay and the VIDAS CMV IgG Avidity assay were used in parallel when enough serum was available and the results were interpreted as recommended by the manufacturer. According to the manufacturer, a LIAISON DiaSorin avidity index <0.200 indicates a primary infection within the last 3 months, an index >0.300 excludes a primary infection in the last 3 months, and an index ranging from 0.200 to 0.300 is considered as intermediate. Similarly, a VIDAS CMV IgG avidity index <0.20 indicates a primary infection in the last 3 months, an index >0.80 excludes a primary infection in the last 3 months, and an index ranging from 0.20 to 0.80 is considered as intermediate. When at least 1 of the 2 avidity tests results was in favor of a primary infection dating more than 3 months back, the woman was reassured; in other cases CMV PCR was performed in maternal serum and amniocentesis for prenatal diagnosis was advised to be performed after 20 weeks of gestation for CMV PCR.

CMV PCR in amniotic fluid and in maternal serum was performed after automated DNA extraction with MagNaPure LC using the total nucleic acid extraction kit (Roche Diagnostic, Meylan, France) followed by amplification using an in-house CMV PCR assay [15, 16]. Follow-up of infected fetuses consisted of targeted ultrasound examination every fortnight and fetal brain magnetic resonance imaging (MRI) was offered at 33 weeks. Termination of pregnancy was offered in cases with cerebral anomalies [17]. Infected babies were followed up with serial perinatal and pediatric examination and auditory brainstem response, as well as ultrasound and MRI of the neonatal brain.

Statistical Methods

Qualitative data were compared by means of χ^2 test or Fisher exact test as appropriate. Student *t* test and Mann-Whitney *U* test were used for parametric and nonparametric variables or unequal standard deviations, respectively. Concordance between the 2 avidity techniques was assessed based on the percentage of concordance and κ statistic. In case of possible associations, a logistic regression model was used to investigate the association between outcome (fetal infection at the time of amniocentesis or at birth) and each of the possible explanatory parameter or possible confounders (gestational age at testing, maternal IgM levels, maternal IgG levels, maternal positive CMV PCR, avidity index by LIAISON $\times 10$, and avidity index by VIDAS $\times 10$). Multivariate logistic regression models were performed including all variables with a $P < .2$ on univariate analysis. To avoid overfitting, we aimed at obtaining multivariate models with at least 1 explanatory variable per 8–10 events, as suggested by the study of Vittinghoff et al [18]. Only models with variables statistically significant were considered.

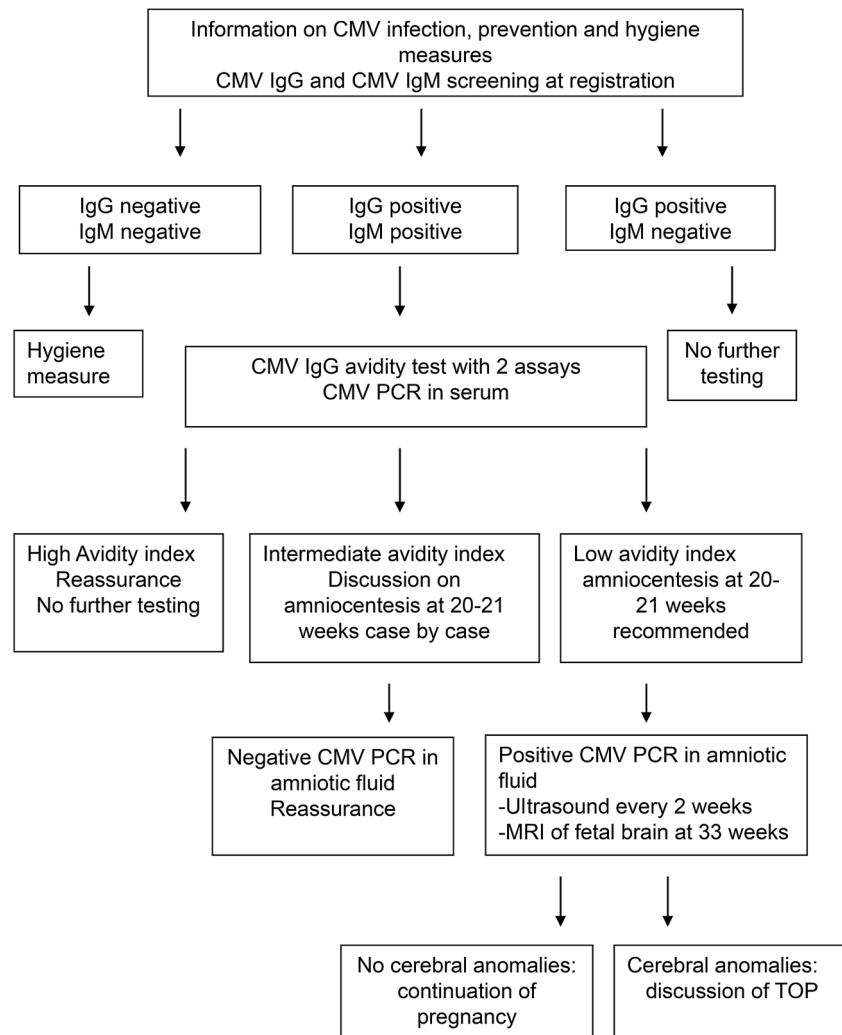


Figure 1. Standardized protocol for cytomegalovirus infection screening in first trimester of pregnancy in the Necker institution. Abbreviations: CMV, cytomegalovirus; IgG, immunoglobulin G; IgM, immunoglobulin M; MRI, magnetic resonance imaging; PCR, polymerase chain reaction; TOP, termination of pregnancy.

Because avidity index values are <1 , for univariate and multivariate analysis we used avidity index values $\times 10$ in order to obtain clinically meaningful odds ratios (ORs).

All tests were 2-tailed and a P value $<.05$ was considered statistically significant.

Because each missing piece of data was unrelated to its value or to the value of other variables, data were considered to be missing at random.

RESULTS

A total of 4931 pregnant women were screened for CMV infection during the study period and 201 (4.1%) had positive or equivocal CMV IgM with positive IgG prior to 14 weeks of gestation at a median of 11 weeks (range, 9–12 weeks)

(Figure 2). Within this group, 183 women had an avidity test done with the 2 assays and 18 had only 1 of the 2 avidity assays (VIDAS, $n = 11$; LIAISON, $n = 7$).

One hundred eighteen of these 201 women (58.7%) had a high avidity index with at least 1 of the 2 assays and could be reassured immediately. However, 83 (41.3%) women had either a low or intermediate avidity test including 45 (22.3%) and 38 (18.9%) with a low or intermediate avidity index, respectively. CMV PCR was done in the maternal serum of 126 of the 201 including 40 of the 83 women with low or intermediate avidity index. The median CMV DNA load in maternal serum with positive CMV PCR was 800 copies/mL (range, 110–56 000 copies/mL) (2.90 log copies/mL [range, 2.04–4.74]).

Details on the 83 women with low or intermediate avidity index are shown in Figure 2, leaving 72 cases for analysis in

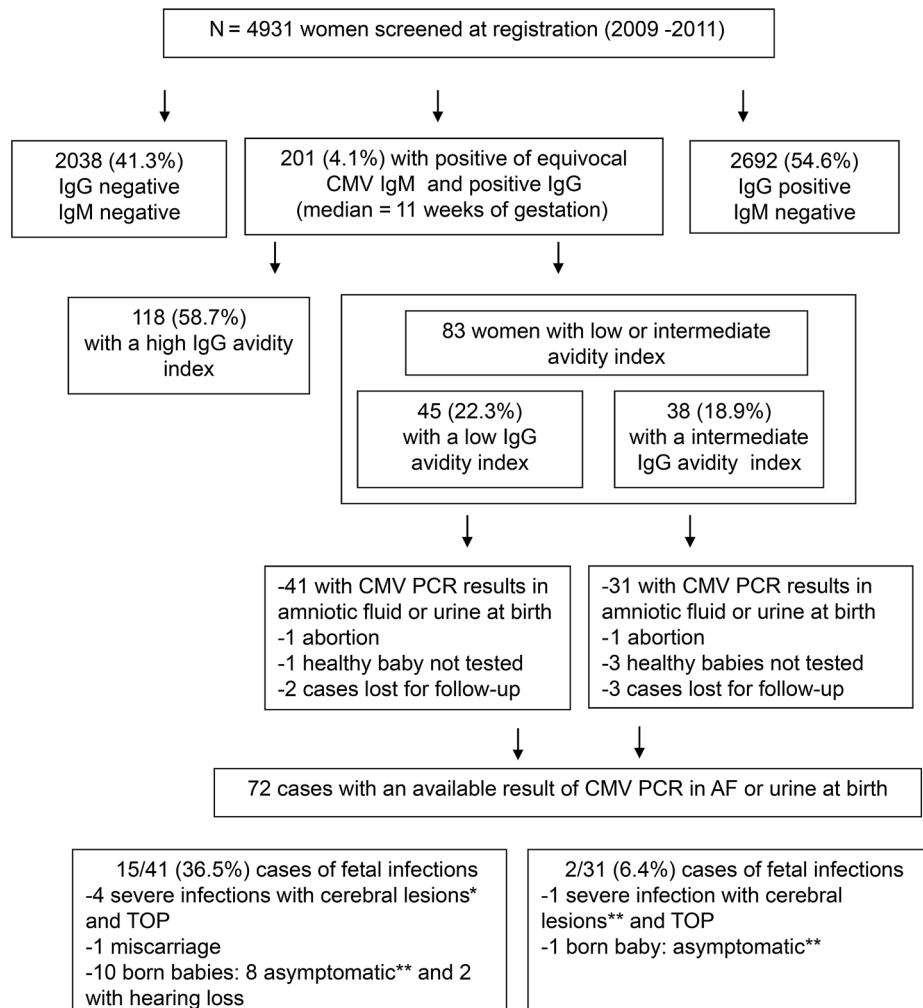


Figure 2. Result of serological cytomegalovirus screening in the retrospective cohort. *Cerebral anomalies in ultrasound, antenatal cerebral magnetic resonance imaging (MRI), and anatomopathology after termination. **Asymptomatic at birth: no clinical symptoms, no anomalies on neonatal MRI, and normal hearing test. Abbreviations: AF, amniotic fluid; CMV, cytomegalovirus; IgG, immunoglobulin G; IgM, immunoglobulin M; PCR, polymerase chain reaction; TOP, termination of pregnancy.

this group. Seventeen (23.6%) of these 72 cases with a CMV PCR results available tested positive for CMV PCR in amniotic fluid and/or in neonatal samples proving congenital infection. Of these 17 cases, 36.5% (15/41) and 6.4% (2/31) were in the group of women with a low or intermediate avidity result, respectively ($P = .002$). The outcome of congenital infections included termination of pregnancy for severe cerebral lesions in 6 cases, 9 asymptomatic newborns in 9 cases, and profound bilateral and unilateral hearing loss in 1 case each.

Factors Associated With Fetal Transmission in the Group of 72 Women With a Low or Intermediate Avidity Test in the First Trimester

Table 1 describes the variables studied in these 72 women. Maternal serum was obtained in the first trimester at a similar

gestational age in both groups (transmitting vs not transmitting), IgM levels were higher, and IgG levels and IgG avidity values with both assays were lower in women who transmitted the virus. CMV PCR in maternal sera was more often positive in these women.

Results of univariate analysis with 6 variables are shown in Table 2. IgM levels and gestational age were the only 2 variables that were not associated with fetal transmission.

Given the number of events, we aimed to build up multivariate models with at least 2 explanatory variables. There were no significant models with 3 variables. Ten bivariate models were tested with the 5 variables showing a P value $< .2$ in univariate analysis. Only 3 bivariate models showed significant association of both variables with fetal transmission (Table 2).

Table 1. Virological Variables by Cytomegalovirus Fetal Transmission Status in the Population of 72 Women

Variable	Overall (N = 72)	CMV Fetal Infection (n = 17)	No Fetal Infection (n = 55)	P Value
Gestational age				
Median (IQR)	11.0 (9.0–12.0)	11.0 (9.0–12.0)	11.0 (9.0–12.0)	.85^a
No.	72	17	55	
LIAISON IgM levels in maternal serum				
Median (IQR)	75.5 (57.5–90.0)	84.5 (75.0–105.0)	72.5 (50.0–88.0)	.048^a
No.	48	12	36	
LIAISON IgG levels in maternal serum				
Median (IQR)	4.40 (2.6–7.3)	2.1 (1.1–3.2)	5.3 (3.9–7.7)	<.001^a
No.	49	12	37	
LIAISON avidity index value				
Median (IQR)	0.164 (0.110–0.240)	0.107 (0.082–0.145)	0.182 (0.125–0.243)	.001^a
No.	56	12	44	
VIDAS avidity index value				
Median (IQR)	0.330 (0.230–0.515)	0.190 (0.125–0.245)	0.445 (0.305–0.570)	<.001^a
No.	64	16	48	
CMV PCR in maternal serum, No. (%)				
Positive	15/40 (37.5%)	8/10 (80%)	7/30 (23.3%)	.0024^b
No.	58	12	46	

P values in boldface indicate significance.

Abbreviations: CMV, cytomegalovirus; IgG, immunoglobulin G; IgM, immunoglobulin M; IQR, interquartile range; PCR, polymerase chain reaction.

^a Mann-Whitney *U* test.

^b Fisher exact test.

Table 2. Factors Associated With Fetal Transmission in Univariate and Bivariate Analysis (Group of 72 Women With Low or Intermediate Avidity Index and Documentation of Fetal Infection)

Variable	β	SE	OR	95% CI	P Value	AIC	R^2
Univariate analysis							
Gestational age	0.01	0.11	1.01	.81–1.27	.900		
LIAISON IgM levels in maternal serum	0.01	0.09	1.01	.99–1.03	.155		
LIAISON IgG levels in maternal serum	0.64	0.22	0.53	.34–.81	.004		
LIAISON avidity index value $\times 10$	–1.91	0.70	0.14	.04–.59	.007		
VIDAS avidity index value $\times 10$	–1.47	0.42	0.23	.09–.53	.001		
Positive CMV PCR in maternal serum	2.57	0.90	13.14	2.24–76.80	.004		
Bivariate analysis							
LIAISON IgG levels in maternal serum	–0.69	0.27	0.49	.29–.84	.010		
LIAISON avidity index value $\times 10$	–2.04	0.88	0.13	.02–.73	.021		
Constant	4.70	1.75	26.8	0.53
Positive CMV PCR in maternal serum	2.51	0.99	12.38	1.77–86.33	.011		
LIAISON avidity index value $\times 10$	–1.83	0.91	0.16	.03–.95	.044		
Constant	0.37	1.38	32.6	0.39
Positive CMV PCR in maternal serum	2.15	1.03	8.59	1.13–65.10	.037		
VIDAS avidity index value $\times 10$	–1.18	0.54	0.31	.11–.88	.028		
Constant	1.46	1.62	31.0	0.43

Values in boldface indicate significance.

Abbreviations: AIC, Akaike criterion; β , estimate; CI, confidence interval; CMV, cytomegalovirus; IgG, immunoglobulin G; IgM, immunoglobulin M; OR, odds ratio; PCR, polymerase chain reaction; SE, standard error.

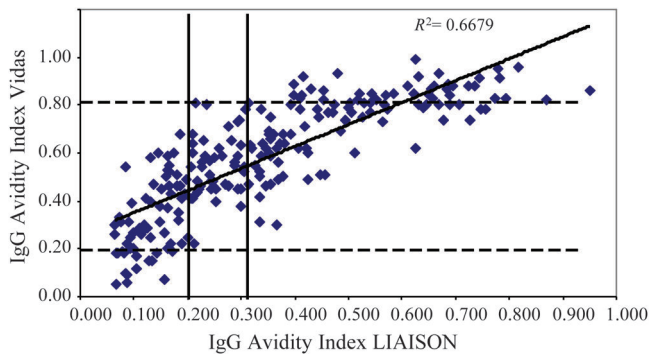


Figure 3. Comparison of avidity index values results obtained with the 2 avidity assays (LIAISON and VIDAS) in 236 serum samples. Abbreviation: IgG, immunoglobulin G.

Comparison of the 2 CMV IgG Avidity Assays

Avidity test was done in parallel with the 2 commercial avidity assays in 166 of the 201 women (236 sera some woman had sequential sera). Avidity index values were roughly correlated ($r^2 = 0.667$; Figure 3), but there was only a 49.5% concordance between avidity test interpretations (Table 3). The κ statistic was 0.306 (95% confidence interval [CI], .237–.375), demonstrating fair agreement.

Relationship Between IgM Levels and IgG Avidity Values in the Population of 236 Sera With Positive IgM and Avidity Results Available With the 2 Tests

Median IgM value was lower (50 AU/mL [range, 15–250 AU/mL]) in the group of 123 sera that had a high avidity index with at least 1 assay than in the group of 113 sera with intermediate or low avidity index (71 AU/mL [range, 22–250 AU/mL], $P < .0001$). There was an inverse statistical correlation between CMV IgM levels and CMV avidity index. For each 1-unit decrease of CMV IgM, there was a 1.1-fold

Table 3. Comparison of Immunoglobulin G Avidity Index Interpretation (Low, Intermediate, High) With the 2 Commercial Assays in 236 Sera From Women With Cytomegalovirus Immunoglobulin M Positive or Equivocal Results

IgG Avidity Index (N = 236)	LIAISON DiaSorin		
	Low	Intermediate	High
Vidas bioMérieux			
Low	22	0	0
Intermediate	49	42	68
High	0	2	53

$\kappa = 0.306$ (95% confidence interval, .237–.375); 49.5% of concordant avidity test interpretation; 50.5% of discordant avidity test interpretation.

Abbreviation: IgG, immunoglobulin G.

increase of having a high LIAISON avidity index (OR, 0.97 [95% CI, .95–.98], $P = .001$) and a high VIDAS avidity (OR, 0.97 [95% CI, .94–.99], $P = .027$). However, the IgM levels were overlapping in the 2 groups (high avidity and low or intermediate one), and no threshold value of IgM levels could be established to differentiate between the 2 groups with a good predictive value (area under the receiver operating characteristic curve, 0.75 and 0.72, respectively).

DISCUSSION

The incidence of positive IgM in pregnant women who enrolled before 12 weeks of gestation (201/4931 [4.1%]) was in agreement with previously published data [19, 20]. A large proportion (58.7%) could be immediately reassured by a high IgG avidity index as demonstrated elsewhere [21, 22]. However, the proportion with a suspicion of recent primary infection (41.3%) among women with positive IgM was higher than reported in the literature, ranging from 14% to 22% [20, 23]. This could reflect either a recruitment bias or a different performance of CMV IgM test used in these studies in terms of specificity or sensitivity. The rate of fetal transmission was 36.5% in the group of women with a suspicion of primary infection in the first trimester of pregnancy (women with low avidity index) and it was 6.4% in the group of women with a suspicion of periconceptual infection (women with intermediate avidity index). These transmission rates are similar to those described in the literature. [24, 25]. The inverse relationship between IgM antibody levels and IgG avidity index has also been previously underlined [23, 26]. However, using an algorithm based on IgM levels alone without avidity testing would be misleading as IgM levels are overlapping in the 2 groups of high and low/intermediate avidity, with extreme values found in both groups.

CMV IgG avidity tests are not well standardized and a recent comparative study reported only moderate agreements between kits when testing a panel of sequential sera collected in pregnant women with primary infection [27]. In our study, the interpretation of avidity test (low, intermediate, high) was concordant with the 2 assays only in 49% of the sera. This discrepancy is 2-fold. Fewer sera (44%) reached high avidity status with the VIDAS than with the LIAISON assay, suggesting that the cutoff value used in the former is too high. This has already been pointed out by other groups [28–30]. In addition, fewer sera (31%) displayed a low avidity with the VIDAS than with the LIAISON assay, as has been reported previously [27].

We have shown that there is a continuous increased risk of vertical transmission with decreasing avidity even within low or intermediate values. In addition, the risk of vertical transmission is further increased with either low IgG titers or a

positive PCR in maternal serum. There are few data available on the kinetics of CMV DNA in serum or plasma of primary infected women, but it is likely to be found within 1–2 months of infection [31]. Therefore, the added value of these associations is likely to reflect a better identification of true infections during pregnancy as opposed to periconceptional or anteconceptional infections with a very low risk of transmission [24, 25]. Another explanation for the predictive value of decreasing avidity index could be that intrauterine transmission could be facilitated when CMV IgG avidity takes longer to mature. Antibody affinity maturation has been shown to be critical for production of high levels of neutralizing antibodies, which are known to protect from fetal transmission [32], suggesting that a defect in affinity maturation might play a role in intrauterine transmission [32]. To test this hypothesis further, it would be interesting to study avidity maturation in sequential sera of pregnant women with primary infection in the first trimester of pregnancy.

Irrespective of the explanation for this association, this variation in the fetal transmission risk according to the index value and the presence or absence of a positive CMV PCR in maternal serum or high IgG titers can be used as a tool to calculate incremental risk of fetal infection.

Strengths of the study include the large sample of women tested and the standardized protocol used for CMV infection screening. Limitations of the study include missing virological data, as the serum sample was too small to achieve all analysis in some women, and clinical missing data as 13% (11/83) of cases with low or intermediate avidity index did not have CMV PCR in amniotic fluid or in urine at birth. However, data were missing at random. We are currently testing the 3 significant models prospectively; however, the number of cases seen prospectively since then is not sufficient to assess any significant change in choice or strategy.

CONCLUSIONS

In our hands, the LIAISON assay was the most effective to exclude a recent primary infection and to reassure up to 60% of women presenting with positive IgM in the first trimester of pregnancy. In the subgroup of women with a low or intermediate avidity, both IgG avidity index values (LIAISON and VIDAS) allow for an accurate prediction of the risk of transmission when used in combination with either the result of CMV PCR in maternal serum or the IgG titers. This strategy may further reduce both the use of invasive procedures and the proportion of women faced with the anxiety of a late diagnosis of fetal infection.

Notes

Acknowledgments. We thank the midwives from the obstetric and fetal medicine department and the technicians of the virology laboratory for their daily work on congenital CMV screening.

Author contributions. M. L.-V., L. J. S., and Y. V. conceived and designed the experiments. Y. S., L. J. S., J. J. S., F. J., and Y. V. counseled the women in the obstetric and fetal medicine department. M. L.-V. and Y. S. coordinated the CMV serology testing and the CMV PCR tests in the virology laboratory. M. L.-V., L. J. S., J. J. S., F. J., and Y. V. were responsible for study design, data interpretation, and manuscript preparation. All authors participated in data interpretation and performed a critical revision of manuscript. L. J. S. was responsible for statistical analysis. All authors approved the final version of the paper.

Potential conflicts of interest. M. L.-V. has received travel grants and honoraria for speaking or participation at meetings or for reviewing scientific projects from DiaSorin and from bioMérieux. Y. V. has received consulting fees as a clinical advisor for Sequenom. All other authors report no potential conflicts.

All authors have submitted the ICMJE Form for Disclosure of Potential Conflicts of Interest. Conflicts that the editors consider relevant to the content of the manuscript have been disclosed.

References

- Dollard SC, Grosse SD, Ross DS. New estimates of the prevalence of neurological and sensory sequelae and mortality associated with congenital cytomegalovirus infection. *Rev Med Virol* **2007**; 17:355–63.
- Kenneson A, Cannon MJ. Review and meta-analysis of the epidemiology of congenital cytomegalovirus (CMV) infection. *Rev Med Virol* **2007**; 17:253–76.
- Fowler KB, Stagno S, Pass RF, Britt WJ, Boll TJ, Alford CA. The outcome of congenital cytomegalovirus infection in relation to maternal antibody status. *N Engl J Med* **1992**; 326:663–7.
- Stagno S, Dworsky ME, Torres J, Mesa T, Hirsh T. Prevalence and importance of congenital cytomegalovirus infection in three different populations. *J Pediatr* **1982**; 101:897–900.
- Nigro G, Adler SP, La Torre R, Best AM. Passive immunization during pregnancy for congenital cytomegalovirus infection. *N Engl J Med* **2005**; 353:1350–62.
- Jacquemard F, Yamamoto M, Costa JM, et al. Maternal administration of valaciclovir in symptomatic intrauterine cytomegalovirus infection. *BJOG* **2007**; 114:1113–21.
- Agence Nationale d'Accréditation et d'Évaluation en Santé. Évaluation de l'intérêt du dépistage de l'infection à cytomégalo­virus chez la femme enceinte en France. ANAES Press, **2004**.
- Mace M, Sissoeff L, Rudent A, Grangeot-Keros L. A serological testing algorithm for the diagnosis of primary CMV infection in pregnant women. *Prenat Diagn* **2004**; 24:861–3.
- Munro SC, Hall B, Whybin LR, et al. Diagnosis of and screening for cytomegalovirus infection in pregnant women. *J Clin Microbiol* **2005**; 43:4713–8.
- Guerra B, Simonazzi G, Banfi A, et al. Impact of diagnostic and confirmatory tests and prenatal counseling on the rate of pregnancy termination among women with positive cytomegalovirus immunoglobulin M antibody titers. *Am J Obstet Gynecol* **2007**; 196:221 e1–6.
- Blackburn NK, Besselaar TG. A study of the effect of chemical inactivants on the epitopes of Rift Valley fever virus glycoproteins using monoclonal antibodies. *J Virol Methods* **1991**; 33:367–74.
- Grangeot-Keros L, Mayaux MJ, Lebon P, et al. Value of cytomegalovirus (CMV) IgG avidity index for the diagnosis of primary CMV infection in pregnant women. *J Infect Dis* **1997**; 175:944–6.
- Bodeus M, Hubinont C, Bernard P, Bouckaert A, Thomas K, Goubau P. Prenatal diagnosis of human cytomegalovirus by culture and polymerase chain reaction: 98 pregnancies leading to congenital infection. *Prenat Diagn* **1999**; 19:314–7.
- Gouarin S, Gault E, Vabret A, et al. Real-time PCR quantification of human cytomegalovirus DNA in amniotic fluid samples from mothers with primary infection. *J Clin Microbiol* **2002**; 40:1767–72.
- Leruez-Ville M, Ouachee M, Delarue R, et al. Monitoring cytomegalovirus infection in adult and pediatric bone marrow transplant

- recipients by a real-time PCR assay performed with blood plasma. *J Clin Microbiol* **2003**; 41:2040–6.
16. Ducroux A, Cherid S, Benachi A, Ville Y, Leruez-Ville M. Evaluation of a new commercial real time PCR quantification assay for prenatal diagnosis of cytomegalovirus congenital infection. *J Clin Microbiol* **2008**; 46:2078–80.
 17. Benoist G, Salomon LJ, Jacquemard F, Daffos F, Ville Y. The prognostic value of ultrasound abnormalities and biological parameters in blood of fetuses infected with cytomegalovirus. *BJOG* **2008**; 115:823–9.
 18. Vittinghoff E, McCulloch CE. Relaxing the rule of ten events per variable in logistic and Cox regression. *Am J Epidemiol* **2007**; 165:710–8.
 19. Picone O, Vauloup-Fellous C, Cordier AG, et al. A 2-year study on cytomegalovirus infection during pregnancy in a French hospital. *BJOG* **2009**; 116:818–23.
 20. Vauloup-Fellous C, Picone O, Cordier AG, et al. Does hygiene counseling have an impact on the rate of CMV primary infection during pregnancy? Results of a 3-year prospective study in a French hospital. *J Clin Virol* **2009**; 46(suppl 4):S49–53.
 21. Bodeus M, Goubau P. Predictive value of maternal-IgG avidity for congenital human cytomegalovirus infection. *J Clin Virol* **1999**; 12:3–8.
 22. Revello MG, Gorini G, Gerna G. Clinical evaluation of a chemiluminescence immunoassay for determination of immunoglobulin G avidity to human cytomegalovirus. *Clin Diagn Lab Immunol* **2004**; 11:801–5.
 23. Dollard SC, Staras SA, Amin MM, Schmid DS, Cannon MJ. National prevalence estimates for cytomegalovirus IgM and IgG avidity and association between high IgM antibody titer and low IgG avidity. *Clin Vaccine Immunol* **2011**; 18:1895–9.
 24. Revello MG, Fabbri E, Furione M, et al. Role of prenatal diagnosis and counseling in the management of 735 pregnancies complicated by primary human cytomegalovirus infection: a 20-year experience. *J Clin Virol* **2011**; 50:303–7.
 25. Enders G, Daiminger A, Bader U, Exler S, Enders M. Intrauterine transmission and clinical outcome of 248 pregnancies with primary cytomegalovirus infection in relation to gestational age. *J Clin Virol* **2011**; 52:244–6.
 26. Prince HE, Leber AL. Validation of an in-house assay for cytomegalovirus immunoglobulin G (CMV IgG) avidity and relationship of avidity to CMV IgM levels. *Clin Diagn Lab Immunol* **2002**; 9: 824–7.
 27. Revello MG, Genini E, Gorini G, Klersy C, Piralla A, Gerna G. Comparative evaluation of eight commercial human cytomegalovirus IgG avidity assays. *J Clin Virol* **2010**; 48:255–9.
 28. Bodeus M, Beulne D, Goubau P. Ability of three IgG-avidity assays to exclude recent cytomegalovirus infection. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* **2001**; 20:248–52.
 29. Dangel V, Bader U, Enders G. Improvement of cytomegalovirus avidity testing by adjusting the concentration of CMV-specific IgG in test samples. *J Clin Virol* **2006**; 35:303–9.
 30. Lagrou K, Bodeus M, Van Ranst M, Goubau P. Evaluation of the new architect cytomegalovirus immunoglobulin M (IgM), IgG, and IgG avidity assays. *J Clin Microbiol* **2009**; 47:1695–9.
 31. Revello MG, Zavattoni M, Sarasini A, Percivalle E, Simoncini L, Gerna G. Human cytomegalovirus in blood of immunocompetent persons during primary infection: prognostic implications for pregnancy. *J Infect Dis* **1998**; 177:1170–5.
 32. Boppana SB, Britt WJ. Antiviral antibody responses and intrauterine transmission after primary maternal cytomegalovirus infection. *J Infect Dis* **1995**; 171:1115–21.

Article 2

Comparaison des tests d'avidité des IgG CMV avec le LIAISON® et le VIDAS® pour le diagnostic d'une primo-infection chez la femme enceinte.

Ce travail s'inscrit dans la continuité directe du premier travail. Lors de l'étude précédente nous avons comparé les résultats obtenus par les trousse d'avidité VIDAS® CMV IgG avidity (BioMérieux) et LIAISON® CMV IgG avidité (Diasorin). Cette comparaison avait montré une corrélation entre les valeurs des taux d'avidité ($R^2 = 0,667$) mais une mauvaise concordance à 49,5% entre les interprétations en avidité faible, moyenne ou forte avec un coefficient kappa de 0,306. En 2013, les fabricants BioMérieux et Diasorin ont chacun mis sur le marché un test d'avidité des IgG CMV de deuxième génération. Nous utilisons ces 2 nouveaux tests en parallèle depuis janvier 2013 dans notre laboratoire.

L'objectif de cette nouvelle étude était de comparer les résultats obtenus avec ces tests d'avidité de seconde génération dans le contexte du diagnostic de la primo-infection chez les femmes enceintes.

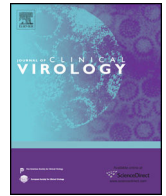
Méthodes : Nous avons analysé rétrospectivement les résultats obtenus avec les 2 tests (VIDAS ® CMV IgG avidity II et le LIAISON ® CMV IgG avidity II) dans 280 échantillons de sérum de femmes enceintes collectés entre janvier 2013 et avril 2015 et présentant des IgG positives associées à des IgM positives.

Résultats : La concordance entre les interprétations données par ces 2 tests de 2^{ème} génération était significativement plus élevée que pour celle observée entre les tests de première génération (77% versus 49%, $p < 0,001$). La plupart des 32% de résultats discordants entre les 2 tests étaient liés au fait que moins de sérums avaient été classés en avidité intermédiaire ou élevée avec le VIDAS® CMV IgG avidity II qu'avec LIAISON® CMV IgG avidity II. Ceci suggère que le test VIDAS® CMV IgG avidity II apprécie la maturation des IgG de façon retardée par rapport au test LIAISON® CMV IgG avidity II. Cependant, 8 sérums prélevés chez 5 femmes enceintes présentaient une discordance importante avec un index d'avidité fort en LIAISON® CMV IgG avidity II alors que l'index d'avidité était faible ou ininterprétable avec le VIDAS® CMV IgG avidity II. Dans 3 de ces 5 cas, les patientes avaient eu une primo-infection très récente prouvée par une séroconversion dans 2 cas et par la concomitance d'IgM à taux élevé et d'une charge virale CMV élevée dans un cas. Dans ces 3 cas, le taux d'IgG était très faible et le test d'avidité des IgG en technique LIAISON ® CMV IgG avidity

Il avait été rendu faussement élevé par l'automate. Les 2 autres cas de discordance s'expliquaient probablement par un défaut du test VIDAS® CMV IgG avidity II qui donnait des valeurs d'avidité encore faibles plus de 3 mois après la primo-infection, dans ces 2 cas le test LIAISON® CMV IgG avidity II permettait ainsi une meilleure datation de la primo-infection.

Discussion : Ainsi chacun des 2 tests présente des avantages et des inconvénients et une bonne connaissance de ces tests est primordiale pour un rendu éclairé des résultats. Le test LIAISON® CMV IgG avidity II peut rendre des résultats faussement élevés dans les primo-infections récentes lorsque les IgG sont basses conduisant à méconnaître une primo-infection. Ainsi, un profil sérologique avec des IgM élevées et des IgG basses (< 50U/ml) associées à un index d'avidité rendu élevé par le test LIAISON® CMV IgG avidity II nécessite d'être contrôlé par un autre test d'avidité afin de ne pas passer à côté d'une primo-infection. En revanche, le test LIAISON® CMV IgG avidity II semble plus performant pour évaluer la maturation des IgG que le test VIDAS® CMV IgG avidity II.

Pour conclure, les résultats d'avidité obtenus par la 2^{ème} génération de trousse de test d'index d'avidité sont plus concordants que ceux obtenus par les tests de première génération ce qui est un grand pas vers la standardisation de ces techniques. Il existe cependant encore des différences entre les 2 tests. Néanmoins, ces limites ne remettent pas en cause l'utilité des tests d'avidité des IgG pour le diagnostic de la primo-infection à CMV pendant la grossesse, mais elles incitent à la prudence dans l'interprétation des résultats notamment lorsque la valeur des IgG est faible.



Short communication

Comparison of the LIAISON[®] CMV IgG Avidity II and the VIDAS[®] CMV IgG Avidity II assays for the diagnosis of primary infection in pregnant women

Yann Sellier^{a,b}, Tiffany Guillemot^{a,c}, Yves Ville^{a,b}, Marianne Leruez-Ville^{a,c,*}^a EA 73-28, Université Paris Descartes, Sorbonne Paris Cité, France^b AP-HP, Maternité et Unité de Médecine Foetale, Hôpital Necker-E.M., Paris 75015, France^c AP-HP, Laboratoire de Microbiologie Clinique, Hôpital Necker-E.M., National Reference Center for Cytomegalovirus-Associated Laboratory, Paris 75015, France

ARTICLE INFO

Article history:

Received 23 June 2015

Received in revised form 27 August 2015

Accepted 31 August 2015

Keywords:

Cytomegalovirus

IgG avidity

LIAISON

VIDAS

Primary infection

ABSTRACT

Background: The accuracy of IgG avidity assays is crucial for the diagnosis of primary CMV infection in pregnancy.

Objective: To compare the performance of the second generation avidity assays LIAISON[®] CMV IgG Avidity II and VIDAS[®] CMV IgG Avidity II for the diagnosis of primary infection in pregnant women.

Study design: In our laboratory, in sera of pregnant women presenting with positive CMV IgG and positive CMV IgM, the two avidity assays were run in parallel from January 2013 to April 2015.

Results: The results of the 2 avidity assays were analyzed in 280 sera. The correlation between the second generation LIAISON[®] and VIDAS[®] avidity results was significantly higher than between the results of the first generation assays (77% versus 49%, $p < 0.001$). Discrepant results were mainly explained by the difficulty of the VIDAS[®] assay to reach intermediate and high avidity status over time, suggesting the superiority of the LIAISON[®] assay to achieve high avidity levels. In 4 sera from 3 pregnant women (1.4%) with documented primary infection the LIAISON[®] avidity was falsely high. In these cases the level of CMV IgG was low (<50 U/mL).

Conclusion: The LIAISON[®] CMV IgG Avidity II assay reached more rapidly higher avidity status than the VIDAS[®] CMV IgG Avidity II. However, with the LIAISON[®] CMV IgG Avidity II, we identified rare sera with high positive avidity values in documented recent seroconversion. The advantages and drawbacks of each assay must be known for a sound interpretation of the results.

© 2015 Elsevier B.V. All rights reserved.

1. Background

Although systematic CMV screening is not recommended in France, CMV serology is frequently performed in the first trimester of pregnancy. When IgG and IgM antibodies are detected, CMV IgG avidity index is used to discriminate between primary infection during or prior to pregnancy based upon the correlation between increased binding avidity of maternal IgG to CMV antigens over time [1–3]. The accuracy of primary infection is crucial to evaluate the risk of fetal transmission and to target women who could be included in clinical trials evaluating the efficacy of treatment with valacyclovir or hyper-immune immunoglobulin to limit fetal trans-

mission [4–6]. Discordance between avidity commercial kits have been reported in the literature [7–10], we use 2 different avidity assays in parallel in our laboratory to determine the occurrence of primary infection during pregnancy. In a previous study, we compared the first generation of CMV IgG avidity assays proposed by Diasorin (LIAISON[®] CMV IgG Avidity) and by BioMerieux (VIDAS[®] CMV IgG Avidity) and found that the concordance between these avidity tests (high, intermediate and low avidity) was only 49.5% [9]. This discrepancy was mainly due to the fact that fewer sera reached the high avidity status with the VIDAS[®] assay than with the LIAISON[®] assay, suggesting that the cut-off values used in the former test were too high. Both manufacturers have since upgraded their CMV avidity assays and we have used these second generation assays in parallel in our laboratory since January 2013 [11].

* Corresponding author at: Hospital Necker-Enfants-malades, 149 rue de Sèvres, Paris 75015, France. Fax: + 33 1 44 49 49 60.

E-mail address: marianne.leruez@nck.aphp.fr (M. Leruez-Ville).

Table 1

Comparison of IgG avidity index interpretation (low, intermediate, high) with the 2 commercial assays in 280 sera from with CMV IgM positive or equivocal results.

N = 280	Avidity II Vidas BioMerieux		
	Low (<0.40)	Intermediate (≥ 0.40 <0.65)	High ≥ 0.65
Avidity II Liaison XL			
Low (<0.150)	49	6	0
Intermediate (≥ 0.150 <0.250)	16	35	3
High ≥ 0.250	8	30	133
78% concordant interpretations			
32% discordant interpretations			

Table 2Details of the virological profile of the 5 cases with sera presenting with low or non-interpretable VIDAS[®] CMV avidity and high LIAISON[®] CMV avidity.

Cases No.	Week of pregnancy	IgG II Liaison XL U/mL	IgM Liaison XL U/mL	Avidity II Liaison XL	IgG Vidas UA/mL	Avidity II Vidas	CMV PCR In blood in cp/mL	Transmission du fœtus and/or newborn ^a
1	12	<5	<5	ND	ND	ND	ND	Yes
	20	29	84	0.466	<6	ND	2700	
2	18	6.5	<5	ND	ND	ND	ND	No
	23	40	26	0.811	<6	ND	ND	
	24	50	48	0.822	<6	ND	ND	
3	17	22	>140	0.317	5	ND	11300	Yes
4	14	31	50	0.314	12	0.25	ND	Yes
	26	48	37	0.305	14	0.38	ND	
5	4	11.5	49	ND	8	0.32	6900	No
	12	80	29	0.295	17	0.37	ND	
	16	69	22	0.439	12	0.39	ND	

ND = not done.

^a Documented by a positive CMV PCR in amniotic fluid and/or in neonatal saliva.

2. Objective

The objective of this study was to compare the results obtained with the LIAISON[®] CMV IgG Avidity II (DiaSorin, Antony, France) and the VIDAS[®] CMV IgG Avidity II (BioMérieux, Marcy L'Etoile, France).

2.1. Study design

CMV IgG and CMV IgM were performed on the Liaison XL platform with LIAISON[®] CMV IgG II and LIAISON[®] CMV IgM. When IgG were positive (>14 U/mL) and IgM were equivocal (≥ 18 U/mL and <22 U/mL) or positive (≥ 22 U/mL), CMV IgG avidity was tested with both the LIAISON[®] and the VIDAS[®] avidity assays. The results were interpreted as recommended by the manufacturer. A LIAISON[®] CMV IgG Avidity II test below 0.150 indicates a primary infection in the last 3 months, an index above 0.250 excludes a primary infection in the last 3 months and an index ranging from 0.150 to 0.250 is considered as intermediate. Similarly, a VIDAS[®] CMV IgG avidity II index below 0.40 indicates a primary infection in the last 3 months, an index above 0.65 excludes a primary infection in the last 3 months and an index ranging from 0.40 to 0.65 is considered as intermediate. CMV DNA load in blood was assessed by a quantitative CMV real time PCR (CMV-R gene, Argene, BioMérieux). Fetal infection was confirmed by the detection of CMV DNA in amniotic fluid or in neonatal saliva samples. Comparison between the correlations of avidity results was done by Chi2 analysis.

3. Results

Between January 2013 and April 2015, 280 sera from pregnant women were found with positive CMV IgG and positive or equivocal CMV IgM and both avidity tests were therefore performed.

The comparison of the results showed that the concordance between the interpretations of avidity assays was 77% (Table 1). The correlation between the results of the second generation LIAISON[®] and VIDAS[®] avidity assays was significantly higher than between the results of the first generation assays (77% versus 49%, $p < 0.001$).

Among the 280 sera tested, there were 8 from 5 pregnant women with a high avidity value obtained with the LIAISON[®] assay and with a low or non-interpretable avidity (because of a negative IgG value) with the VIDAS[®] assay. To better understand these cases, previous or subsequent sera from these 5 women were also studied when available (Table 2). In cases 1 and 2, seroconversion was identified to have occurred less than 3 months before (5 and 8 weeks before respectively), in case 3 we could not obtain an earlier serum sample but the virological profile of this case was in favour of a recent primary infection with high IgM value and high CMV DNA load in maternal blood.

In case 4, the avidity was high with the LIAISON[®] assay and low with the VIDAS[®] assay at 14 weeks of pregnancy, no earlier serum was available but on subsequent sera obtained at 26 weeks of pregnancy, therefore more than 3 months after the first one, the avidity with the VIDAS[®] assay remained low while the avidity with the LIAISON[®] assay was high as could be expected after 3 months. Although in the absence of a previous serum, one cannot be certain which test gave a correct result at 14 weeks, the VIDAS[®] result in the second sample is obviously misleading as the primary infection happened more than 3 months before. In case 5, seroconversion happened at around 4 weeks of pregnancy, 2 and 3 months later the LIAISON[®] avidity values were already high while the VIDAS[®] avidity values were still low.

4. Discussion

The correlation between the second generation LIAISON[®] and VIDAS[®] avidity assays is significantly better than the correlation

described between first generation assays ($p < 0.001$). However, most of the discrepant results (81%) between the 2 tests were due to the fact that fewer sera reached the intermediate avidity status or the high avidity status with the VIDAS[®] CMV IgG Avidity II assay than with the LIAISON[®] CMV IgG Avidity II assay, suggesting that the cut-off values used in the former test are probably still too high. Lumley et al. have also recently underlined the superiority of the LIAISON[®] assay to achieve high avidity levels. In their work, the persistence of low IgG avidity over more than 3 months after primary infection was reported in 9% of sera with the ARCHITECT CMV IgG Avidity assay while the LIAISON[®] assay was able to generate high avidity values in due time [10].

The highly discrepant results (low VIDAS[®] Avidity contrasting with high LIAISON[®] avidity) obtained in 5 cases have two different explanations. In 2 cases the discrepant results were due to persisting low avidity over 3 months with the VIDAS[®] assay while the LIAISON[®] assay was able to detect IgG maturation. In another 3 cases, the LIAISON[®] avidity values were obvious falsely high which could have led to miss 3 true cases of primary infections (with fetal transmission in 2 cases) if no other tests would have been performed. These 3 cases were recent primary infections with low IgG value (between 22 and 50 U/mL). Berth et al. also reported analytical issues affecting the performance of avidity index in cases of low CMV IgG levels. However, in their study, in contrast with ours, rare cases of falsely low avidity values were found in sera from immune subjects with low levels of IgG and negative IgM [12].

In conclusion, this comparative study of the second-generation avidity assays LIAISON[®] and VIDAS[®] showed encouraging results with improved correlation between tests. The LIAISON[®] CMV IgG Avidity II assay reached high avidity status more rapidly than the Vidas assay. However, we identified a previously undescribed pitfall of this assay since in 3 pregnant women with ongoing primary infections; the LIAISON[®] CMV IgG Avidity II assay gave falsely high positive values. These limits do not challenge the usefulness of avidity assays for the diagnosis of CMV primary infection in pregnancy but they emphasise the need for caution in the interpretation of the results particularly when the IgG value are low.

Funding

None.

Ethical approval

Not required.

Competing interest

MLV declare having received travel grants and honoraria for speaking or participation at meetings or for reviewing scientific

project from DiaSorin and from BioMerieux. Others authors declare no competing interests relevant to this work.

Acknowledgments

We thank the mid-wives from the Obstetric and Fetal medicine department and the technicians of the Virology Laboratory for their daily work on congenital CMV screening.

References

- [1] N.K. Blackburn, T.G. Besselaar, B.D. Schoub, K.F. O'Connell, Differentiation of primary cytomegalovirus infection from reactivation using the urea denaturation test for measuring antibody avidity, *J. Med. Virol.* 33 (January (1)) (1991) 6–9.
- [2] L. Grangeot-Keros, M.J. Mayaux, P. Lebon, F. Freymuth, G. Eugene, R. Stricker, et al., Value of cytomegalovirus (CMV) IgG avidity index for the diagnosis of primary CMV infection in pregnant women, *J. Infect. Dis.* 175 (April (4)) (1997) 944–946.
- [3] T. Lazzarotto, L. Gabrielli, M. Lanari, B. Guerra, T. Bellucci, M. Sassi, et al., Congenital cytomegalovirus infection: recent advances in the diagnosis of maternal infection, *Hum. Immunol.* 65 (May (5)) (2004) 410–415.
- [4] F. Jacquemard, M. Yamamoto, J.-M. Costa, S. Romand, E. Jaqz-Aigrain, A. Dejean, et al., Maternal administration of valganciclovir in symptomatic intrauterine cytomegalovirus infection, *BJOG Int. J. Obstet. Gynaecol.* 114 (September (9)) (2007) 1113–1121.
- [5] G. Nigro, S.P. Adler, R. La Torre, A.M. Best, Congenital Cytomegalovirus Collaborating Group, Passive immunization during pregnancy for congenital cytomegalovirus infection, *N. Engl. J. Med.* 353 (September (13)) (2005) 1350–1362.
- [6] M.G. Revello, T. Lazzarotto, B. Guerra, A. Spinillo, E. Ferrazzi, A. Kustermann, et al., A randomized trial of hyperimmune globulin to prevent congenital cytomegalovirus, *N. Engl. J. Med.* 370 (April (14)) (2014) 1316–1326.
- [7] K. Lagrou, M. Bodeus, M. Van Ranst, P. Goubau, Evaluation of the new architect cytomegalovirus immunoglobulin M (IgM), IgG, and IgG avidity assays, *J. Clin. Microbiol.* 47 (June (6)) (2009) 1695–1699.
- [8] M.G. Revello, E. Genini, G. Gorini, C. Klersy, A. Piralla, G. Gerna, Comparative evaluation of eight commercial human cytomegalovirus IgG avidity assays, *J. Clin. Virol.* 48 (August (4)) (2010) 255–259.
- [9] M. Leruez-Ville, Y. Sellier, L.J. Salomon, J.J. Stirnemann, F. Jacquemard, Y. Ville, Prediction of fetal infection in cases with cytomegalovirus immunoglobulin M in the first trimester of pregnancy: a retrospective cohort, *Clin. Infect. Dis.* 56 (May (10)) (2013) 1428–1435.
- [10] S. Lumley, M. Patel, P.D. Griffiths, The combination of specific IgM antibodies and IgG antibodies of low avidity does not always indicate primary infection with cytomegalovirus, *J. Med. Virol.* 86 (May (5)) (2014) 834–837.
- [11] C. Vauloup-Fellous, M. Berth, F. Heskia, J.-M. Dugua, L. Grangeot-Keros, Re-evaluation of the VIDAS[®] cytomegalovirus (CMV) IgG avidity assay: determination of new cut-off values based on the study of kinetics of CMV-IgG maturation, *J. Clin. Virol.* 56 (February (2)) (2013) 118–123.
- [12] M. Berth, L. Grangeot-Keros, F. Heskia, J.-M. Dugua, C. Vauloup-Fellous, Analytical issues possibly affecting the performance of commercial human cytomegalovirus IgG avidity assays, *Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.* 33 (September (9)) (2014) 1579–1584.

Article 3

Peut-on établir un pronostic fiable d'une infection fœtale par le cytomégalo virus au moment du diagnostic au 2ème trimestre de la grossesse ?

L'infection fœtale à CMV est avérée par la détection positive de l'ADN viral par PCR dans le liquide amniotique obtenu par amniocentèse. Une fois l'infection fœtale établie, il va être crucial d'évaluer le plus précisément et le plus rapidement possible le pronostic de ce fœtus infecté. L'échographie fœtale est un élément majeur de ce bilan pronostic mais n'est pas suffisante pour prédire avec une fiabilité absolue si le futur nouveau-né aura ou non des symptômes liés au CMV à la naissance. Lorsque le fœtus présente dès le diagnostic ou plus tardivement une atteinte cérébrale sévère, le pronostic est mauvais et une interruption médicale de grossesse peut d'emblée être discutée. La valeur prédictive négative d'une échographie normale et stable depuis le diagnostic jusqu'à la fin de la grossesse est comprise entre 85 et 95% selon les séries (118–121). La valeur prédictive négative de l'échographie au moment du diagnostic au 2ème trimestre est peu documentée. Par ailleurs, au 2ème trimestre la présence de signes échographiques extra-cérébraux ou cérébraux modérés a une valeur prédictive positive d'anomalies à la naissance peu étudiée et rapportée à 55% dans une seule étude. Ainsi l'échographie ne suffit pas pour déterminer avec précision le pronostic d'un fœtus infecté et la valeur prédictive de l'échographie pourrait être améliorée par la combinaison de son résultat à ceux de certains paramètres biologiques et virologiques fœtaux (118,122).

L'objectif de notre étude était d'évaluer rétrospectivement la valeur pronostique de la combinaison des résultats de l'échographie fœtale, du niveau de charge virale dans le liquide amniotique (ajustée au délai entre la séroconversion et l'amniocentèse), du taux de plaquettes fœtales et du niveau de charge virale dans le sang fœtal au moment du diagnostic de l'infection fœtale.

Résultats et discussion : A partir du logiciel du laboratoire, ont été identifiés 82 cas d'infections fœtales diagnostiqués et suivis à l'hôpital Necker-Enfants-malades entre 2008 et 2013. Parmi ces 82 cas, 19 fœtus avaient présenté des anomalies cérébrales sévères et n'ont pas été inclus dans cette étude. Les autres 63 cas dont 41 avaient une échographie normale au diagnostic et 22 présentaient des anomalies extra-cérébrales ou cérébrales mineures à l'échographie constituent le groupe d'étude. Le diagnostic d'infection fœtale avait été fait à une médiane de 23 semaines d'aménorrhée (interquartile 22-28).

L'analyse des différents paramètres en régression logistique montrait en analyse univariée que le risque d'être symptomatique à la naissance était 18 fois plus élevé en cas de présence d'un ou plusieurs signes échographiques extra cérébraux ou cérébraux non sévères, 5,77 fois plus élevé pour chaque augmentation de 1 log de la charge virale sanguine fœtale, 0,74 fois moins élevé pour chaque augmentation de 10000/ mm³ du taux de plaquettes fœtales et 2,3 plus élevé pour chaque augmentation de 1 log de la charge virale dans le liquide amniotique ajustée au délai entre la séroconversion et l'amniocentèse. Les signes échographiques extra cérébraux ou cérébraux mineurs avaient à eux seuls des valeurs prédictives négative et positive de la présence de symptômes à la naissance de 93% et 60% respectivement. L'association de l'absence de signes échographiques extra cérébraux ou cérébraux mineurs et de l'absence d'une charge virale dans le liquide amniotique > à 1 MoM (multiple de la médiane= ratio de la charge virale mesurée sur la charge virale médiane correspondant au même délai entre primo-infection maternelle et amniocentèse) avaient une valeur prédictive négative de 95%. L'association de l'absence de signes échographiques extra cérébraux ou cérébraux mineurs et de l'absence d'une charge virale sanguine fœtale $\geq 4,93 \log_{10}$ UI/ml ou d'un taux de plaquettes fœtales $\leq 114\ 000/\text{mm}^3$ avait une valeur prédictive négative de 100%. Et enfin, l'association de signes échographiques extra cérébraux ou cérébraux mineurs et de la présence d'une charge virale sanguine fœtale $\geq 4,93 \log_{10}$ UI/ml ou d'un taux de plaquettes fœtales $\leq 114\ 000/\text{mm}^3$ avait une valeur prédictive positive de 79%.

Nous avons ainsi pu démontrer dans cette étude l'apport des paramètres biologiques fœtaux dans le bilan pronostique précoce de l'infection. Dans la littérature, la plupart des études n'avaient pu démontrer de lien entre la charge virale dans le liquide amniotique et le pronostic (127–129,334). En effet, la charge virale dans le liquide amniotique augmente tout au long de la grossesse probablement car l'ADN du CMV s'y accumule et que la production d'urine augmente aussi. Le fait d'avoir ajusté la charge virale dans le liquide amniotique au délai entre la primo-infection maternelle et l'amniocentèse nous a ainsi permis de révéler un lien entre charge virale élevée et pronostic. Cependant, les marqueurs sanguins fœtaux ont un poids plus important dans le pronostic, ainsi la mesure de la charge virale fœtale sanguine et du taux de plaquettes fœtales permet de prédire avec une excellente sensibilité et une bonne spécificité la survenue de symptômes à la naissance et le risque de handicap. Ces résultats nous semblent justifier le recours à la cordocentèse dans le cadre du bilan pronostique d'une infection fœtale.

OBSTETRICS

Feasibility of predicting the outcome of fetal infection with cytomegalovirus at the time of prenatal diagnosis



Marianne Leruez-Ville, MD; Julien Stirnemann, MD; Yann Sellier, MSc; Tiffany Guilleminot, BA; Anne Dejean, MSc; Jean-François Magny, MD; Sophie Couderc, MD; François Jacquemard, MD; Yves Ville, MD

BACKGROUND: Congenital cytomegalovirus infection occurs in 0.7% of live births with 15-20% of infected children developing long-term disability including hearing loss and cognitive deficit. Fetal cytomegalovirus infection is established by viral DNA amplification by polymerase chain reaction in amniotic fluid obtained by amniocentesis following maternal seroconversion or after the diagnosis of ultrasound features suggestive of fetal infection. Severe brain ultrasound anomalies are associated with a poor prognosis. The prognosis of an infected fetus showing either no ultrasound features or nonsevere ultrasound anomalies is difficult to establish up until late in the second or third trimester of pregnancy.

OBJECTIVE: We sought to evaluate the prognostic value of fetal ultrasound, amniotic fluid, and fetal blood analysis at the time of prenatal diagnosis of fetal infection.

STUDY DESIGN: We reviewed all cases of fetal cytomegalovirus infection with a sample of amniotic fluid positive for viral DNA and/or fetal blood analyzed in our laboratory from 2008 through 2013. Prenatal ultrasound features along with cytomegalovirus DNA loads in amniotic fluid and in fetal blood and fetal platelet counts were reviewed in relation to gestational age at maternal infection, neonatal examination, and postnatal follow-up or postmortem examination.

RESULTS: In all, 82 fetuses were infected following maternal infection mainly in the first trimester. At the time of prenatal diagnosis at a median of 23 weeks, 19, 22, and 41 fetuses showed severe brain ultrasound abnormalities, nonsevere ultrasound features, and normal ultrasound examination, respectively. Nonsevere ultrasound features, higher DNA load in amniotic fluid, fetal platelet count $\leq 114,000/\text{mm}^3$, and DNA load

$\geq 4.93 \log_{10}$ IU/mL in fetal blood were associated with a symptomatic status at birth in univariate analysis ($P < .001$, $P = .001$, and $P = .018$, respectively). Bivariate analysis combining ultrasound results and either adjusted viral load in amniotic fluid or fetal blood profile showed that these were independent prognostic factors of a symptomatic status at birth. Both fetal blood parameters were better predictors than amniotic fluid viral load. At the time of prenatal diagnosis, the ultrasound negative predictive value for symptoms at birth or at termination of pregnancy was 93%. The combined negative predictive values of ultrasound and viral load in amniotic fluid and that of ultrasound and fetal blood parameters were 95% and 100%, respectively. In fetuses presenting with nonsevere ultrasound features, the positive predictive values of ultrasound alone and in combination with amniotic fluid viral load or with fetal blood parameters were 60%, 78%, and 79%, respectively.

CONCLUSION: Risk assessment of infected fetuses for being symptomatic at birth is possible as early as the time of diagnosis by using a combination of targeted ultrasound examination along with viral load in amniotic fluid and in fetal blood together with platelet count. The advantage of using amniotic fluid is that it is available at prenatal diagnosis. One may wonder if increasing the negative predictive value of the overall assessment of an infected fetus from 95-100% is worth the additional risk of cordocentesis for fetal blood sampling. This can only be an individual decision made by well-informed women and it seems therefore appropriate to use the figures presented here and their confidence intervals for counseling.

Key words: cytomegalovirus, fetal DNA, fetal platelet count, prenatal diagnosis, ultrasound

Introduction

Congenital cytomegalovirus (CMV) infection occurs in 0.7% of live births¹ and 15-20% of infected children develop long-term disability including hearing loss (HL) and cognitive deficit.² Fetal CMV infection can be proven by viral DNA amplification in the amniotic

fluid (AF) obtained by amniocentesis following documented maternal seroconversion or suggestive ultrasound (US) features.³⁻¹⁰ When severe brain US anomalies are present, the prognosis is poor.^{11,12} The prognosis of an infected fetus showing either no US features or nonsevere US anomalies is difficult to establish up until late in the second or third trimester of pregnancy. However, prognostic assessment at 20-24 weeks can be crucial, particularly in countries where termination of pregnancy (TOP) is not allowed at a later stage in pregnancy, but also to consider fetal treatment.¹³

We aimed to evaluate the prognostic value of fetal US together with that of AF

and fetal blood analysis at the time of diagnosis in a series of proven fetal CMV infections.

Materials and Methods

Study population

Fetuses with a prenatal diagnosis of CMV infection and at least 1 prenatal sample of AF and/or fetal blood analyzed for CMV quantitative polymerase chain reaction (PCR) in our laboratory from 2008 through 2013 were included in the study. All cases were from the Paris area and were followed up at the fetal medicine unit of Hôpital Necker-Enfants Malades either from the beginning of the pregnancy or after referral for a positive CMV PCR in AF diagnosed in

Cite this article as: Leruez-Ville M, Stirnemann J, Sellier Y, et al. Feasibility of predicting the outcome of fetal infection with cytomegalovirus at the time of prenatal diagnosis. *Am J Obstet Gynecol* 2016;215:342.e1-9.

0002-9378/\$36.00

© 2016 Elsevier Inc. All rights reserved.

<http://dx.doi.org/10.1016/j.ajog.2016.03.052>



Click Supplemental Materials and Video under article title in Contents at

TABLE 1
Classification of ultrasound abnormalities

Severe US brain abnormalities	Mild US brain abnormalities	Extracerebral US abnormalities
Ventriculomegaly ≥ 15 mm	Mild ventriculomegaly (>10 – 15 mm)	Hyperechogenic bowel ⁴¹
Periventricular hyperechogenicity	Intraventricular adhesions	Hepatomegaly (left lobe ≥ 40 mm) ⁴⁰
Hydrocephalus	Intracerebral calcifications	Splenomegaly (longest diameter ≥ 40 mm) ⁴²
Microcephaly $< -2SD$	Subependymal cysts	Intrauterine growth retardation (< 5 th centile)
Increased cisterna magna ≥ 8 mm	Choroid plexus cysts	Oligoamnios (deepest vertical pool < 2.5 cm)
Vermian hypoplasia	Calcifications of lenticulostriate vessels in basal ganglia	Polyhydramnios (deepest vertical pool > 10 cm)
Porencephaly		Ascites
Lissencephaly		Pleural effusion
Periventricular cystic lesions of white matter		Fetal hydrops, subcutaneous edema
Agenesis of corpus callosum		Placentomegaly ≥ 40 mm ⁴³
		Intrahepatic calcifications

US, ultrasound.

Leruez-Ville et al. Prognosis evaluation of fetal CMV infection. *Am J Obstet Gynecol* 2016.

another center. Prenatal data were reviewed including time of maternal primary infection, fetal serial US, magnetic resonance imaging (MRI) examination, and follow-up. Outcome was assessed by targeted neonatal examination or postmortem examination following TOP.

Evaluation of maternal infection type and date of maternal primary infection

All available sera were analyzed retrospectively or prospectively for CMV IgG, CMV IgM, and CMV IgG avidity. The LIAISON CMV IgG, CMV IgM, and CMV IgG avidity assays were used until October 2012 (DiaSorin, Antony, France). From October 2012, the LIAISON XL CMV IgG, CMV IgM, and CMV IgG avidity assays were used (DiaSorin). The assessment of the onset of primary infection was based on clinical symptoms. In their absence, the onset was set arbitrarily halfway between the date of the last negative serum sample and the first positive one. In addition, an IgG avidity test of $< 10\%$ was considered consistent with an onset of infection within the previous 3 weeks.¹⁴ Prenatal diagnosis following maternal primary infection was achieved by amniocentesis

performed at least 6 weeks following seroconversion and not earlier than 20 weeks' gestation.³

Quantitative CMV PCR assay

DNA extraction was performed from 200 μL of AF with the MagNaPure LC using the total nucleic acid extraction kit (Roche Diagnostic, Meylan, France). DNA extraction was performed from 200 μL of fetal whole blood using the QiaAmp DNA mini blood kit (Qiagen, les Ulis, France). DNA extracts from fetal blood were amplified both undiluted and 1:10 diluted. DNA amplification used a real-time quantitative CMV PCR assay (CMV-R Gene, Argene BioMerieux, Marcy l'Etoile, France). Results were expressed in copies/mL and in IU/mL in AF and in fetal blood samples, respectively. The results obtained in whole blood with the Argene commercial test were calibrated to an international reference standard made available since 2010.¹⁵

Prenatal follow-up of infected fetuses

All infected fetuses were followed up in our fetal medicine unit. Amniocentesis was performed following either maternal primary infection or the diagnosis of suggestive US features. Fetal

blood sampling by cordocentesis to check for fetal platelets and fetal viremia was offered in cases with an infected fetus (positive CMV PCR in AF).¹⁶

Infected fetuses were followed up by US every 2-3 weeks. US features suggestive of fetal CMV infection were recorded as part of serial targeted fetal US examination. Ventriculomegaly was defined as increased measurement of lateral ventricles at level of glomus. Hydrocephalus was defined as triventricular or quadriventricular dilatation in relation with microencephaly in this case. The right lobe of liver was measured in parasagittal plane as described in Vintzileos et al.⁴⁰ Measurement > 40 mm in second trimester is considered abnormal and as fetuses were examined at mean of 23 wk, this cut-off was chosen accordingly (see [video 1](#)). Hyperechogenic bowel was only considered when echogenicity of bowel was equal or more intense than that of fetal bones (see [video 2](#)).⁴¹ Fetal cerebral MRI was performed at 32-34 weeks of gestation or earlier if US examination suspected brain lesions. Brain anomalies were subdivided into severe and mild ([Table 1](#)). Fetuses were classified as having severe US abnormalities when showing at least 1 severe brain abnormality. Fetuses were classified as having

nonsevere US abnormalities when showing at least 1 extracerebral abnormality or 1 mild brain abnormality (Table 1). TOP was discussed for fetuses with cerebral abnormalities on US or on MRI.

Antenatal treatment

Some women with an infected fetus presenting with nonsevere US anomalies, fetal viremia >3000 copies/mL, or fetal platelets $<100,000/\text{mm}^3$ were given valacyclovir orally (8 g per day) from the time of prenatal diagnosis up until delivery as part of an ongoing clinical trial (CYMEVAL II: NCT 01651585).

Classification in symptomatic and asymptomatic infection at birth

Symptomatic or asymptomatic status at birth relied on a combination of clinical examination, laboratory assessment (platelet count, liver enzymes, and serum bilirubin levels), audiometric assessment by automated auditory brainstem response, and cerebral imaging following the classification recently used in the study from Kimberlin et al.¹⁷ Babies with normal clinical examination findings, normal laboratory assessment, normal hearing, and normal imaging were classified into the asymptomatic group. Babies with abnormal clinical examination findings (intrauterine growth restriction [IUGR], petechiae, purpura, microcephaly, seizures, lethargy/hypotonia, poor suck, hepatosplenomegaly, hearing loss); severe abnormal cerebral imaging (multiple intracranial calcifications, periventricular hyperechogenicity, or severe ventriculomegaly [>15 mm]); and/or abnormal laboratory assessment (thrombocytopenia) were classified into the symptomatic group. Neonates presenting with normal clinical examination and only mild abnormalities at cerebral imaging including mild ventriculomegaly (<15 mm), pseudocysts in the germinal matrix, or echogenic lenticulostriated vessels were not considered as symptomatic.

An autopsy was performed in all cases of TOP, and fetuses were classified as symptomatic when overt

cerebral abnormalities such as microcephaly, ventriculomegaly, necrosis of the white matter in association with diffuse lesions of vasculitis, and encephalitis were seen at fetal brain histopathology.

Statistical analysis

Univariate logistic regression models were used to investigate the association between outcome (symptomatic or asymptomatic at birth) and each one of the following parameters as obtained within 1-2 weeks of prenatal diagnosis: US features, viral load in AF and in fetal blood, and fetal platelet count. Bivariate logistic regression models were based on combinations of US features and laboratory parameters obtained in AF (viral load) and in fetal blood (viral load and platelet count).

To better assess the prognostic value of fetal blood parameters, the combined value of fetal blood viral load and platelet count was studied using a recursive partitioning model.

CMV DNA load in AF has been shown to increase with gestational age¹⁸; therefore viral load in AF was adjusted to the time interval between seroconversion and amniocentesis by linear regression and presented in multiples of the median.

All tests were 2-tailed and a *P* value $<.05$ was considered statistically significant.

Ethics

All women gave written consent for the results of their screening tests to be used anonymously for research purposes. All women who underwent amniocentesis gave written consent for CMV prenatal diagnosis. According to French laws, institutional review board was obtained for offering prenatal treatment using valacyclovir for fetal infection (2011-001610-34).

Results

Population (Figure 1)

In all, 92 fetuses were diagnosed with CMV infection from 2008 through 2013 with at least 1 antenatal AF and/or fetal blood sample analyzed in our laboratory. Of these, 10 were not considered for

analysis because the status of the neonate was incompletely documented (5 cases) or because autopsy was not performed following TOP (5 cases). Among the 82 cases included for analysis, quantitative CMV PCR was done in our laboratory in AF, fetal blood, and in both AF and fetal blood in 65, 65, and 49 cases, respectively. Some cases had only an AF sample studied in Hôpital Necker-Enfants Malades laboratory because cordocentesis was declined. Other cases had only a fetal blood sample analyzed in our laboratory because amniocentesis and CMV PCR were performed in another center, and the patient with an infected fetus was referred to Hôpital Necker-Enfants Malades for further counseling and management.

In all, 81 of these 82 cases of fetal infection followed maternal primary infection in the first, second, and third trimester in 62, 13, and 4 cases, respectively. The time of the primary maternal infection was unknown in 2 cases and 1 case arose from nonprimary maternal infection.

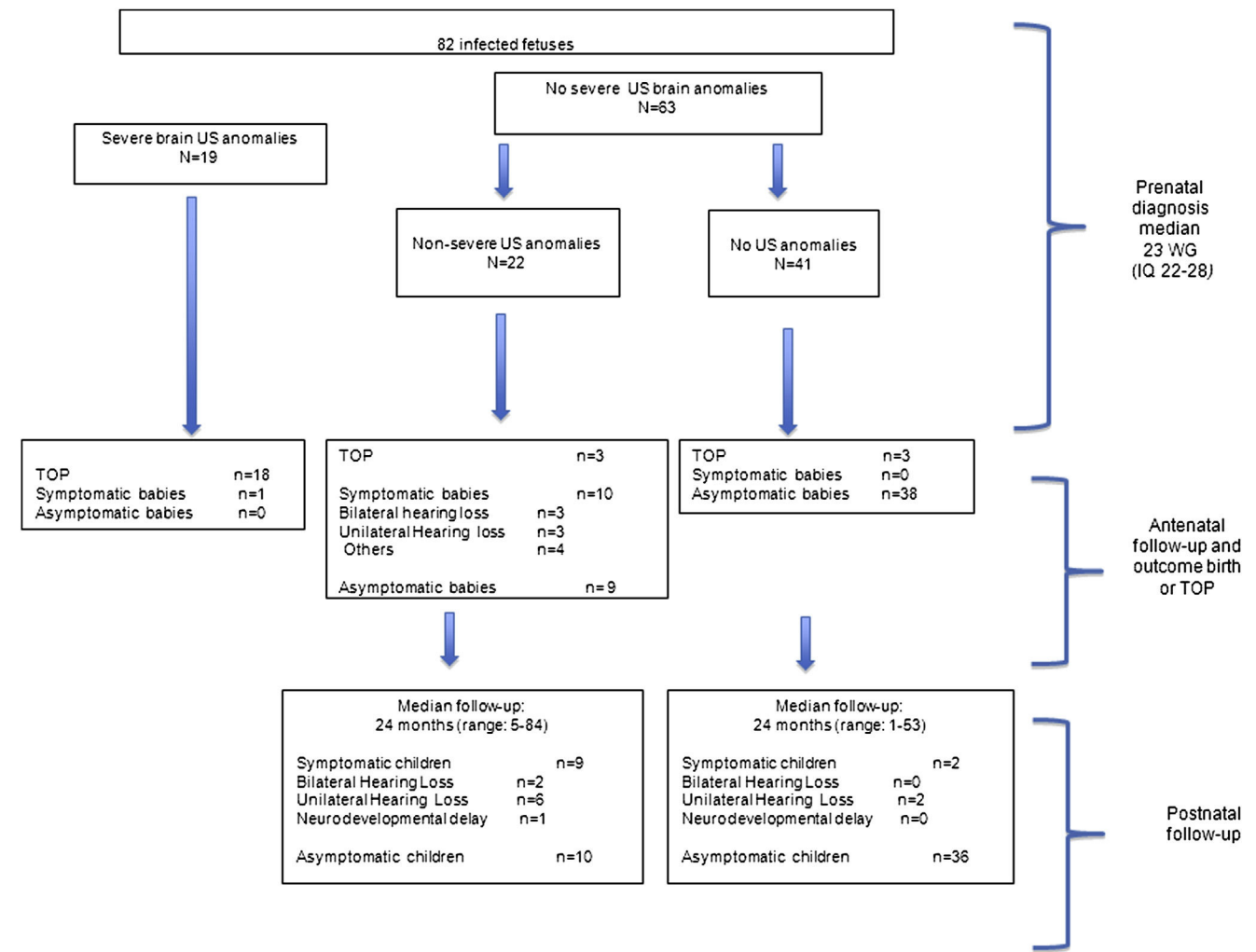
US abnormalities at the time of prenatal diagnosis (Figure 1)

The median gestational age at amniocentesis was 23 (interquartile range 22-28) weeks. At the time of prenatal diagnosis, brain abnormalities were seen on US in 19 of 82 cases. Among the 63 other cases, 41 presented without any US features but 22 cases presented with at least 1 nonsevere US abnormality (Table 2). In 12 of 22 cases there was only 1 isolated US abnormality including hyperechogenic bowel, IUGR, and hepatomegaly and splenomegaly in 8, 3, and 1 case, respectively. In the other 10 cases there was a combination of 2-3 nonsevere US abnormalities.

Antenatal treatment

In the group of 63 cases without severe brain US abnormalities, 37 women received valacyclovir orally, including 18 (44%) of 41 cases without any US features and 19 (86%) of 22 cases with nonsevere US abnormalities. In this population, prenatal valacyclovir treatment was not associated with a better prognosis ($P = 1.0$).

FIGURE 1
Description of population



IQ, interquartile range; *TOP*, termination of pregnancy; *US*, ultrasound; *WG*, weeks of gestation.

Leruez-Ville et al. Prognosis evaluation of fetal CMV infection. *Am J Obstet Gynecol* 2016.

Prenatal and postnatal follow-up (Figure 1)

TOP was performed in 18 of the 19 cases with severe brain abnormalities diagnosed by US at the time of prenatal diagnosis. All 18 terminated fetuses were classified as symptomatic at autopsy; the only live-born baby in this group was severely symptomatic and is now severely handicapped.

Among the 41 cases without any US features at the time of prenatal diagnosis, 38 had an uneventful prenatal follow-up leading to the birth of 38 asymptomatic neonates, while 3

subsequently developed severe brain US abnormalities in the late second or third trimester of pregnancy leading to TOP. Of these 38 babies, 36 remained asymptomatic at follow-up and 2 developed delayed unilateral HL at the age of 18 and 24 months, respectively.

In the group of 22 cases with non-severe US abnormalities at the time of prenatal diagnosis, 3 developed severe brain lesions leading to TOP. Nineteen babies were born alive; 9 of them were asymptomatic and remained so at ages up to 6-84 months except for 1 who

developed mild unilateral HL after the age of 1 year. Ten babies were symptomatic at birth with unilateral hearing loss (3 cases), bilateral hearing loss (3 cases), isolated IUGR (1 case), isolated thrombocytopenia (1 case) and an association of thrombocytopenia and IUGR (2 cases). Two of the 4 neonates with normal audiometry at birth developed unilateral HL in the second year of life. One child was born with isolated thrombocytopenia and showed both motor and cognitive developmental delay at the age of 26 months.

Contribution of fetal laboratory parameters in the group of 63 cases without severe brain US abnormalities at the time of prenatal diagnosis

Figure 2, A, shows that CMV DNA levels in AF increased with the time interval from seroconversion to amniocentesis and those were therefore adjusted accordingly and expressed in multiples of the median in subsequent statistical analyses. Distribution of CMV DNA loads in fetal blood as well as that of fetal platelet count according to symptomatic or asymptomatic status at birth or at TOP are shown in Figure 2, B.

Recursive partitioning model applied to the combined interpretation of CMV DNA load and platelet count in fetal blood showed that if the platelet count was $\leq 114,000/\text{mm}^3$ there was a 62.5% risk of a symptomatic status at birth or at TOP and if the platelet count was $>114,000/\text{mm}^3$ the risk of a symptomatic status was 57% in cases with CMV DNA load $\geq 4.93 \log_{10}$ IU/mL in fetal blood but dropped to 3.1% if the viral load was $<4.93 \log_{10}$ IU/mL (Figure 3). Based on this model, the fetal blood profile was classified as abnormal when platelet count was $\leq 114,000/\text{mm}^3$ or CMV DNA level was $\geq 4.93 \log_{10}$ IU/mL.

Univariate analysis showed that any one of the following—presence of nonsevere US features, higher viral load in AF, higher viral load in fetal blood, lower fetal platelet count, or abnormal fetal blood profile—was significantly associated with a symptomatic status at birth or at TOP ($P < .001$, $P = .018$, $P = .001$, $P = .002$, and $P = .001$, respectively). Bivariate analysis of US assessment combined with either adjusted viral load in AF or fetal blood profile showed that the 3 factors were independently predictive of the status at birth or at TOP (Table 2).

Receiver operating characteristic curve analysis comparing adjusted CMV DNA load in AF with CMV DNA load in fetal blood and with fetal platelet count showed that both fetal blood parameters were better predictors of the status

TABLE 2
Prognostic factors of symptomatic status at birth or at termination of pregnancy in 63 fetuses presenting with no ultrasound features or nonsevere ultrasound features at time of prenatal diagnosis at 23 (interquartile range 22–28) weeks

	Logistic regression		
	OR	95% CI	Pvalue
Univariate model			
CMV DNA in fetal blood (for each 1 log of IU/mL increase) N = 54	5.77	2.02–16.53	.001
Platelet count (per each 10,000/ mm^3 increase) N = 49	0.74	0.60–0.89	.002
Presence of nonsevere US symptoms N = 63	18.29	4.29–78.04	<.001
Abnormal fetal blood results N = 50	40.44	4.64–352.72	.001
Adjusted CMV DNA in amniotic fluid (for each 1 log of IU/mL increase) N = 48	2.31	1.15–4.64	.018
Bivariate model			
Presence of nonsevere US symptoms	10.45	1.96–55.63	.006
Adjusted CMV DNA in amniotic fluid (for each 1 log of IU/mL increase) N = 48	2.35	1.09–5.08	.03
Abnormal fetal blood results	17.76	1.92–164.02	.011
Presence of nonsevere US symptoms N = 50	5.36	1.01–28.53	.049

Complete laboratory data were not available for all cases. Some amniocenteses were done in another center and therefore amniotic fluid sample was not tested in Hôpital Necker-Enfants Malades laboratory and some women declined cordocentesis.

Abnormal fetal blood results = platelet count $\leq 114,000/\text{mm}^3$ and/or CMV DNA load $\geq 4.93 \log_{10}$ IU/mL.

CI, confidence interval; CMV, cytomegalovirus; OR, odds ratio; US, ultrasound.

Leruez-Ville et al. Prognosis evaluation of fetal CMV infection. Am J Obstet Gynecol 2016.

at birth or TOP than AF viral load (Figure 4).

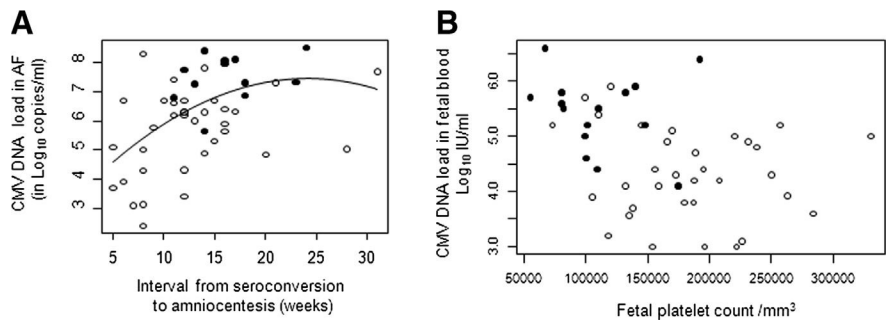
Positive predictive value (PPV) and negative predictive value (NPV) of nonsevere US features alone or combined with fetal laboratory parameters are reported in Table 3.

In our study, asymptomatic neonates have a good prognosis since none developed neurological impairment or bilateral HL. We could not make any statistical correlation between fetal parameters and long-term outcome because the length of postnatal follow-up was not homogeneous within the cohort with 7 asymptomatic neonates lost to follow-up: 3 were not seen after birth and 3 were seen for the last time at the 4-month visit with 21 children followed up for <24 months.

Comment

Congenital CMV infection is a burden affecting 0.7% of all neonates worldwide.² Prenatal diagnosis is feasible and usually performed either as a result of screening for maternal primary infection in pregnancy, mainly in the first and early second trimester of pregnancy,^{14,19-21} or upon the discovery of suggestive US features in the fetus.^{16,22-25} However, since only around 10% of infected fetuses will be symptomatic at birth, the prognosis remains difficult to establish early enough for considering TOP or prenatal treatment in those cases likely to become severely symptomatic in the third trimester of pregnancy or at birth. The originality of the present study is in the choice of assessing the prognostic value of US features together with laboratory

FIGURE 2
Distribution of fetal cytomegalovirus DNA loads and platelet counts



A, CMV DNA levels in copies/mL in relation to time interval between maternal infection and amniocentesis; curve represents mean value obtained by linear regression. **B**, Scatter plot showing CMV DNA loads in fetal blood as well as fetal platelet counts in relation to asymptomatic or symptomatic status at birth or at termination of pregnancy (TOP). Empty dots are cases asymptomatic at birth; full dots are cases symptomatic at birth or at TOP.

Leruez-Ville et al. Prognosis evaluation of fetal CMV infection. Am J Obstet Gynecol 2016.

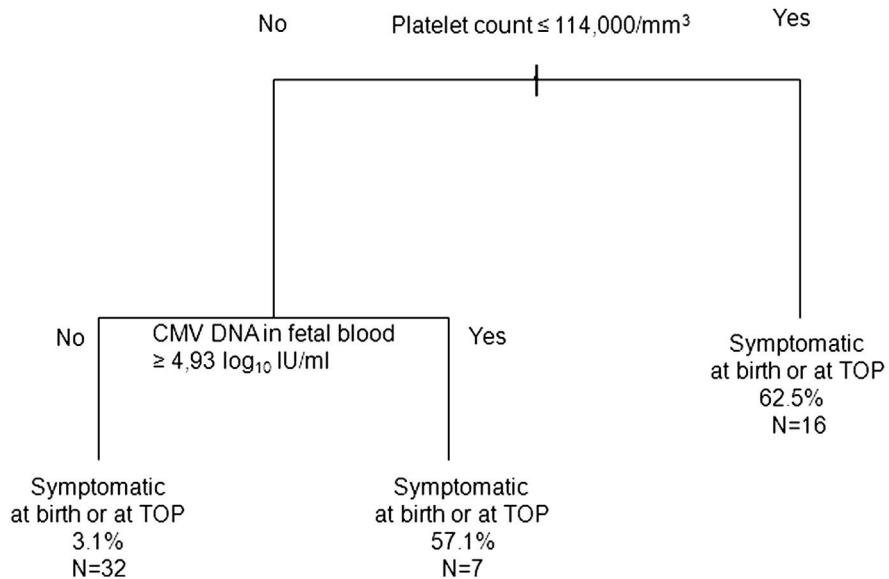
parameters at the time of prenatal diagnosis in a large population of well-documented cases of fetal infection following maternal primary CMV infection that occurred mainly in the first trimester of pregnancy.

Prognostic value and limitations of fetal imaging

Severe brain involvement in the second trimester of pregnancy led to a dismal prognosis, as expected.^{16,26} However, the most valuable contribution of our

cohort is in its subgroup presenting either with no US features or with nonsevere US features (Table 1). Previous contributions identified a residual risk of severe infection at birth including deafness and more severe neurodevelopmental abnormalities of 1-5% and 0-5%, respectively, when US examination of an infected fetus was considered to be normal.^{25,27-29} These risk estimates were based on imaging, and mainly US alone, throughout the pregnancy.^{23,25-27} Indeed the severity of brain involvement might be delayed up until late in pregnancy and the prognostic value of US at diagnosis is expected to be lower than the prognostic value of imaging obtained later in pregnancy. However, we report a 93% NPV of US features gathered at the time of diagnosis for the presence of symptoms at birth or at TOP for severe brain abnormalities. This is therefore comparable to the reported overall performance of imaging, including fetal MRI, throughout pregnancy.^{16,22-25} However, a normal US examination or the presence of nonsevere symptoms missed 3 of 41 (7%) cases that eventually progressed to become severely symptomatic in the third trimester. This 7% uncertainty is therefore what pregnant women have to deal with when deciding to continue with the pregnancy following a positive amniocentesis for CMV at 23 weeks with either normal US examination or the presence of nonsevere abnormalities.

FIGURE 3
Contribution of fetal laboratory parameters to the prognosis



Algorithm of contribution of cytomegalovirus (CMV) DNA load in fetal blood and of fetal platelet count in establishing prognosis of infected fetus (recursive partitioning model).

TOP, termination of pregnancy.

Leruez-Ville et al. Prognosis evaluation of fetal CMV infection. Am J Obstet Gynecol 2016.

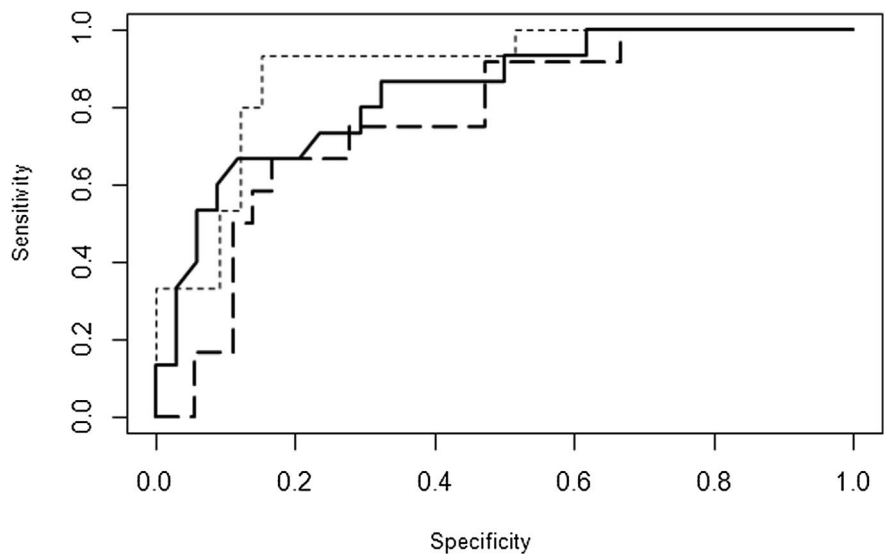
Added prognostic value of laboratory parameters

In our population, a fetal blood profile showing platelet count >114,000/mm³, CMV DNA fetal blood level <4.93 log₁₀ IU/mL, or a low adjusted AF viral load can reduce this uncertainty further down to 0% or 5% for any symptoms at birth (Table 3). We have previously reported that the PPV of isolated extracerebral US features at any time during the pregnancy being overall symptomatic at birth was 55%.¹⁴ This is compatible with the 60% PPV found for nonsevere US features in the current study although based on a different

cohort. In this population of fetuses with nonsevere US features at the time of diagnosis, an abnormal fetal blood profile or a high adjusted AF viral load reduced this uncertainty further with PPV of 79% and 78%, respectively, for any symptom at birth (Table 3).

The advantage of using AF for CMV quantitative PCR is that it can be done on the fluid sampled and used to establish prenatal diagnosis. However its interpretation has become controversial^{15,30-34} in part because of a significant positive correlation between gestational age at amniocentesis and the CMV DNA load in AF^{18,33} but also with the time interval between maternal primary infection and amniocentesis.¹⁸ This increase in CMV DNA loads in AF with gestation is likely to reflect the accumulation of CMV DNA excreted over time as well as the enhanced fetal urine production throughout pregnancy.³⁵ In our study, the time of maternal primary infection was known in almost all cases and CMV DNA load in AF was adjusted to the interval between amniocentesis and maternal primary infection. Higher adjusted CMV DNA loads in AF were significantly associated with a symptomatic status at birth (Figure 2). However, the level of CMV DNA in AF was not as good a predictor of being symptomatic at birth or leading to late development of severe brain lesions in utero as were fetal blood parameters including platelet count and viral load (Figure 4). Fetal blood sampling by cordocentesis for diagnostic purposes, particularly karyotyping, has fallen into disuse and has largely been replaced by amniocentesis, hence reducing its practice to a few centers that are involved in fetal blood transfusions. However, blood analysis in congenital CMV infection has proven useful for the assessment of infected neonates.³⁶⁻³⁸ Similarly, its application to the fetus has shown that both thrombocytopenia and high viral load in fetal blood were associated with a higher risk of giving birth to a symptomatic neonate or leading to TOP for severe brain abnormalities.^{16,39} The cut-off values reported here for platelet count and

FIGURE 4
Receiver operating curves for prediction of symptomatic status



Receiver operating characteristic curves comparing value of adjusted cytomegalovirus DNA load in amniotic fluid (large hatched line) and in fetal blood (small hatched line) and of fetal platelet count (bold line) for prediction of symptomatic status at birth or at termination of pregnancy.

Leruez-Ville et al. Prognosis evaluation of fetal CMV infection. *Am J Obstet Gynecol* 2016.

CMV DNA load may therefore be used in clinical decision-making algorithms. However, it should be stressed that even if standardized units have been used, the implementation of CMV DNA load cut-off values should be validated in different clinical and laboratory settings.

Strengths and limitations of this study

The additional strengths of our study are the extensive longitudinal prenatal assessment including serial imaging together with invasive fetal testing and the use of strict criteria of TOP only in cases with undisputable brain lesions all

TABLE 3
Positive and negative predictive values of nonsevere ultrasound features alone or combined with fetal laboratory parameters for any symptoms at birth or at termination of pregnancy

	PPV	NPV
Nonsevere US features alone N = 63	60%	93%
Nonsevere US features and adjusted CMV DNA in amniotic fluid >1 MoM N = 58	78%	90%
Nonsevere US features or adjusted CMV DNA in amniotic fluid >1 MoM N = 58	44%	95%
Nonsevere US features and abnormal fetal blood results N = 53	79%	91%
Nonsevere US features or abnormal fetal blood results N = 53	50%	100%

CMV, cytomegalovirus; MoM, multiples of median; NPV, negative predictive value; PPV, positive predictive value; US, ultrasound.

Leruez-Ville et al. Prognosis evaluation of fetal CMV infection. *Am J Obstet Gynecol* 2016.

confirmed at autopsy with significant macroscopic and microscopic lesions. This should help to overcome the main limitations of previous series in which autopsy findings of viral inclusions were used to justify severity.³⁹

One limitation of this study is that although the total number of infected fetuses was relatively large (N = 82), we focused on a smaller subgroup of 63 fetuses for which all 3 laboratory parameters were not always available. Another limitation is that the duration of postnatal follow-up, although a median of 18 months, varied, with some children lost for follow-up and others too recently born. Finally, valacyclovir given to some pregnant women to treat infected fetuses as part of an ongoing trial could have hampered the interpretation of our results. However and possibly because fetuses with nonsevere US anomalies were more often treated than fetuses without any US anomalies (86% vs 44%), treatment with valacyclovir was not associated with a better prognosis in this population, thus not interfering with the interpretation of fetal parameters to predict neonatal outcome.

Conclusion

Prognostic assessment of fetuses infected with CMV for the risk of being symptomatic at birth is possible as early as the time of diagnosis in the second trimester by using a combination of targeted US examination, viral load in the AF and in fetal blood, together with platelet count. One may wonder if increasing the NPV of the overall assessment of an infected fetus from 95-100% is relevant and worth the additional risk of cordocentesis for fetal blood sampling. This can only be an individual decision made by well-informed women and it seems therefore appropriate to use the figures presented here and their confidence interval for counseling. ■

References

- Dollard SC, Grosse SD, Ross DS. New estimates of the prevalence of neurological and sensory sequelae and mortality associated with congenital cytomegalovirus infection. *Rev Med Virol* 2007;17:355-63.
- Kenneson A, Cannon MJ. Review and meta-analysis of the epidemiology of congenital cytomegalovirus (CMV) infection. *Rev Med Virol* 2007;17:253-76.
- Bodéus M, Hubinont C, Bernard P, Bouckaert A, Thomas K, Goubau P. Prenatal diagnosis of human cytomegalovirus by culture and polymerase chain reaction: 98 pregnancies leading to congenital infection. *Prenat Diagn* 1999;19:314-7.
- Liesnard C, Donner C, Brancart F, Gosselin F, Delforge ML, Rodesch F. Prenatal diagnosis of congenital cytomegalovirus infection: prospective study of 237 pregnancies at risk. *Obstet Gynecol* 2000;95:881-8.
- Lazzarotto T, Varani S, Guerra B, Nicolosi A, Lanari M, Landini MP. Prenatal indicators of congenital cytomegalovirus infection. *J Pediatr* 2000;137:90-5.
- Revello MG, Fabbri E, Furione M, et al. Role of prenatal diagnosis and counseling in the management of 735 pregnancies complicated by primary human cytomegalovirus infection: a 20-year experience. *J Clin Virol* 2011;50:303-7.
- Feldman B, Yinon Y, Tepperberg Oikawa M, Yoeli R, Schiff E, Lipitz S. Pregestational, periconceptional, and gestational primary maternal cytomegalovirus infection: prenatal diagnosis in 508 pregnancies. *Am J Obstet Gynecol* 2011;205:342.e1-6.
- Picone O, Vauloup-Fellous C, Cordier AG, et al. A series of 238 cytomegalovirus primary infections during pregnancy: description and outcome. *Prenat Diagn* 2013;33:751-8.
- Benoist G, Leruez-Ville M, Magny JF, Jacquemard F, Salomon LJ, Ville Y. Management of pregnancies with confirmed cytomegalovirus fetal infection. *Fetal Diagn Ther* 2013;33:203-14.
- Society for Maternal-Fetal Medicine (SMFM); Hughes BL, Gyamfi-Bannerman C. Society for Maternal-Fetal Medicine (SMFM) consult no. 39: diagnosis and antenatal management of congenital cytomegalovirus (CMV) infection. *Am J Obstet Gynecol* 2016;214:B5-11.
- Noyola DE, Demmler GJ, Nelson CT, et al. Early predictors of neurodevelopmental outcome in symptomatic congenital cytomegalovirus infection. *J Pediatr* 2001;138:325-31.
- Ancora G, Lanari M, Lazzarotto T, et al. Cranial ultrasound scanning and prediction of outcome in newborns with congenital cytomegalovirus infection. *J Pediatr* 2007;150:157-61.
- Jacquemard F, Yamamoto M, Costa J-M, et al. Maternal administration of valacyclovir in symptomatic intrauterine cytomegalovirus infection. *BJOG* 2007;114:1113-21.
- Leruez-Ville M, Sellier Y, Salomon LJ, Stirnemann JJ, Jacquemard F, Ville Y. Prediction of fetal infection in cases with cytomegalovirus immunoglobulin M in the first trimester of pregnancy: a retrospective cohort. *Clin Infect Dis* 2013;56:1428-35.
- Hirsch HH, Lautenschlager I, Pinsky BA, et al. An international multicenter performance analysis of cytomegalovirus load tests. *Clin Infect Dis* 2013;56:367-73.
- Benoist G, Salomon LJ, Jacquemard F, Daffos F, Ville Y. The prognostic value of ultrasound abnormalities and biological parameters in blood of fetuses infected with cytomegalovirus. *BJOG* 2008;115:823-9.
- Kimberlin DW, Jester PM, Sánchez PJ, et al. Valganciclovir for symptomatic congenital cytomegalovirus disease. *N Engl J Med* 2015;372:933-43.
- Gouarin S, Gault E, Vabret A, et al. Real-time PCR quantification of human cytomegalovirus DNA in amniotic fluid samples from mothers with primary infection. *J Clin Microbiol* 2002;40:1767-72.
- Guerra B, Simonazzi G, Banfi A, et al. Impact of diagnostic and confirmatory tests and prenatal counseling on the rate of pregnancy termination among women with positive cytomegalovirus immunoglobulin M antibody titers. *Am J Obstet Gynecol* 2007;196:221.e1-6.
- Duff P. A thoughtful algorithm for the accurate diagnosis of primary CMV infection in pregnancy. *Am J Obstet Gynecol* 2007;196:196-7.
- Cahill AG, Odibo AO, Stamilio DM, Macones GA. Screening and treating for primary cytomegalovirus infection in pregnancy: where do we stand? A decision-analytic and economic analysis. *Am J Obstet Gynecol* 2009;201:466.e1-7.
- Enders G, Bäder U, Lindemann L, Schalasta G, Daiminger A. Prenatal diagnosis of congenital cytomegalovirus infection in 189 pregnancies with known outcome. *Prenat Diagn* 2001;21:362-77.
- Guerra B, Simonazzi G, Puccetti C, et al. Ultrasound prediction of symptomatic congenital cytomegalovirus infection. *Am J Obstet Gynecol* 2008;198:380.e1-7.
- Lipitz S, Hoffmann C, Feldman B, Tepperberg-Dikawa M, Schiff E, Weisz B. Value of prenatal ultrasound and magnetic resonance imaging in assessment of congenital primary cytomegalovirus infection. *Ultrasound Obstet Gynecol* 2010;36:709-17.
- Farkas N, Hoffmann C, Ben-Sira L, et al. Does normal fetal brain ultrasound predict normal neurodevelopmental outcome in congenital cytomegalovirus infection? *Prenat Diagn* 2011;31:360-6.
- Gaytant MA, Steegers EAP, Semmekrot BA, Merkus HMMW, Galama JMD. Congenital cytomegalovirus infection: review of the epidemiology and outcome. *Obstet Gynecol Surv* 2002;57:245-56.
- Benoist G, Salomon LJ, Mohlo M, Suarez B, Jacquemard F, Ville Y. Cytomegalovirus-related fetal brain lesions: comparison between targeted ultrasound examination and magnetic resonance imaging. *Ultrasound Obstet Gynecol* 2008;32:900-5.
- Picone O, Simon I, Benachi A, Brunelle F, Sonigo P. Comparison between ultrasound and magnetic resonance imaging in assessment of

fetal cytomegalovirus infection. *Prenat Diagn* 2008;28:753-8.

29. Lipitz S, Yinon Y, Malinger G, et al. Risk of cytomegalovirus-associated sequelae in relation to time of infection and findings on prenatal imaging. *Ultrasound Obstet Gynecol* 2013;41:508-14.

30. Guerra B, Lazzarotto T, Quarta S, et al. Prenatal diagnosis of symptomatic congenital cytomegalovirus infection. *Am J Obstet Gynecol* 2008;183:476-82.

31. Lazzarotto T, Guerra B, Lanari M, Gabrielli L, Landini MP. New advances in the diagnosis of congenital cytomegalovirus infection. *J Clin Virol* 2008;41:192-7.

32. Revello MG, Zavattoni M, Furione M, Baldanti F, Gerna G. Quantification of human cytomegalovirus DNA in amniotic fluid of mothers of congenitally infected fetuses. *J Clin Microbiol* 1999;37:3350-2.

33. Picone O, Costa J-M, Leruez-Ville M, Ernault P, Olivi M, Ville Y. Cytomegalovirus (CMV) glycoprotein B genotype and CMV DNA load in the amniotic fluid of infected fetuses. *Prenat Diagn* 2004;24:1001-6.

34. Goegebuuer T, Van Meensel B, Beuselinck K, et al. Clinical predictive value of real-time PCR quantification of human cytomegalovirus DNA in amniotic fluid samples. *J Clin Microbiol* 2009;47:660-5.

35. Rabinowitz R, Peters MT, Vyas S, Campbell S, Nicolaides KH. Measurement of

fetal urine production in normal pregnancy by real-time ultrasonography. *Am J Obstet Gynecol* 1989;161:1264-6.

36. Rivera LB, Boppana SB, Fowler KB, Britt WJ, Stagno S, Pass RF. Predictors of hearing loss in children with symptomatic congenital cytomegalovirus infection. *Pediatrics* 2002;110:762-7.

37. Lanari M, Lazzarotto T, Venturi V, et al. Neonatal cytomegalovirus blood load and risk of sequelae in symptomatic and asymptomatic congenitally infected newborns. *Pediatrics* 2006;117:e76-83.

38. Ross SA, Novak Z, Fowler KB, Arora N, Britt WJ, Boppana SB. Cytomegalovirus blood viral load and hearing loss in young children with congenital infection. *Pediatr Infect Dis J* 2009;28:588-92.

39. Fabbri E, Revello MG, Furione M, et al. Prognostic markers of symptomatic congenital human cytomegalovirus infection in fetal blood. *BJOG* 2011;118:448-56.

40. Vintzileos AM, Neckles S, Campbell WA, Andreoli JW, Kaplan BM, Nochimson DJ. Fetal liver ultrasound measurements during normal pregnancy. *Obstet Gynecol* 1985;66:477-80.

41. Slotnick RN, Abuhamad AZ. Prognostic implications of fetal echogenic bowel. *Lancet* 1996;347:85-7.

42. Hata T, Deter RL. A review of fetal organ measurements obtained with ultrasound: normal growth. *J Clin Ultrasound* 1992;20:155-74.

43. Grannum PA. Ultrasound examination of the placenta. *Clin Obstet Gynaecol* 1983;10:459-73.

Author and article information

From Equioe d'accueil 73-28, Université Paris Descartes, Sorbonne Paris Cité, Paris (Drs Leruez-Ville, Stirnemann, Magny, and Ville, Mr Sellier, Ms Guilleminot, and Ms Dejean); Laboratoire de Microbiologie Clinique (Dr Leruez-Ville and Ms Guilleminot), Maternité, Unité de Médecine Fœtale (Drs Stirnemann and Ville, Mr Sellier, and Ms Dejean), and Réanimation Néonatale (Dr Magny), Assistance publique-Hôpitaux de Paris, Hôpital Necker-Enfants Malades, Paris; Centre National de Référence Cytomegalovirus-Laboratoire Associé, Paris (Dr Leruez-Ville and Ms Guilleminot); Department of Obstetrics and Fetal Medicine, Poissy Hospital, Poissy (Dr Couderc); Hôpital Intercommunal de Poissy-Saint Germain, Maternité, Poissy (Dr Jacquemard); and Hôpital Américain de Paris, Unité de Médecine prénatale, Neuilly Sur Seine, France (Dr Jacquemard).

Received March 22, 2016; accepted March 31, 2016.

Dr Leruez-Ville received financial support for meeting expenses from BioMerieux outside the submitted work. The remaining authors report no conflict of interest.

This work was presented at the 24th World Congress on Ultrasound in Obstetrics and Gynecology, Barcelona, Spain, Sept. 14-17, 2014.

Corresponding author: Marianne Leruez-Ville, MD. marianne.leruez@nck.aphp.fr

Article 4

PPAR γ est activé lors d'une infection congénitale à cytomégalovirus et inhibe la neurogenèse de cellules souches neurales humaines

PPAR γ est un facteur de transcription cellulaire au rôle pléiotropique qui est en particulier impliqué (physiologiquement) dans la migration et l'invasion du trophoblaste pendant la grossesse. Lors d'une infection à HCMV, on observe une augmentation de l'activation de PPAR γ dans le placenta provoquant une migration et une invasion anormale du trophoblaste (306). Le HCMV serait également impliqué dans l'infection des cellules progénitrices neuronales et inhiberait leur prolifération et leur différenciation en neurones. Des études ont démontré que PPAR γ ou des agonistes de PPAR γ ont un rôle crucial dans le développement du cerveau de la souris ou l'homéostasie de progéniteurs neuraux *in vitro* (330).

L'objectif de notre étude était de déterminer si l'expression et/ou l'activité de PPAR γ sont modifiées par le HCMV et de connaître l'impact de cette modification d'expression sur les Cellules Souches Neurales (NSC) et leur potentiel de différenciation.

L'analyse a reposé sur une étude *in vitro* mais aussi *ex vivo*. Notre équipe a contribué à l'apport d'analyse *ex vivo* de tissus cérébraux fœtaux infectés par le HCMV avec anomalie cérébrale entre 23 et 28 SA.

Ex vivo, les 20 cerveaux de fœtus humains infectés congénitalement par le HCMV étaient marqués positivement au PPAR γ (détecté par immunohistochimie) alors que les cerveaux contrôles ne l'étaient pas. La localisation du marquage PPAR γ était dans les zones péri-ventriculaires et dans les zones germinatives. En revanche, le marquage n'était pas retrouvé dans la substance blanche hormis sur le pourtour des vaisseaux sanguins (dans les contrôles comme dans les témoins). Il a déjà été décrit que les vaisseaux sanguins exprimaient de façon physiologique de PPAR γ (335). Nous avons également pu détecter des cellules positives à IE entourées par des cellules positives PPAR γ .

In vitro, une perturbation de la neurogenèse a été mise en évidence dans les cultures de NCS infectées par le HCMV. L'impact était d'autant plus important que le ratio virus cellule était élevé (1 MOI et 10 MOI). Nous avons observé que les cultures de cellules infectées exprimaient de façon significative plus de PPAR γ que les cellules non infectées. Une augmentation de l'activité de PPAR γ était observée même en absence d'antigène viral IE. Le

nombre de neurones produits était significativement plus faible dans les NCS-PPAR γ non infectées lorsqu'elles étaient traitées par la rosiglitazone, que dans les autres cultures.

Dans les cultures non infectées les cellules augmentaient leur niveau de PPAR γ en réponse au 9-HODE (9-Hydroxyoctadecadienoic acid), même en dehors de tout contexte infectieux. Dans ces conditions encore, une diminution de la quantité de neurones produits était observée.

Pour conclure, nous avons démontré que 1) l'activation pharmacologique ou l'expression ectopique de PPAR γ était suffisante pour diminuer la neurogenèse depuis les NSC non infectées, 2) dans les NSC infectées par le HCMV, le traitement au T0070907, un inhibiteur du PPAR γ restaure un taux normal de différenciation. De plus, le rôle de PPAR γ dans la physiopathologie de l'infection à CMV est fortement supposé par l'immuno-détection de PPAR γ nucléaire dans les zones péri-ventriculaires et plus particulièrement dans les zones germinatives de cerveaux fœtaux infectés de façon congénitale par le HCMV. Les cellules infectées par le HCMV (IE positif) étaient entourées par des cellules positives PPAR γ , ce qui renforce l'hypothèse que la réplication virale augmenterait l'expression PPAR γ tant dans l'hôte que dans les cellules voisines. Ces données suggèrent donc que PPAR γ serait impliqué dans la neurogenèse, et tout particulièrement, serait un effecteur clé dans la physiopathologie de l'infection congénitale à HCMV.

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 Santé 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-Téléthon) (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).

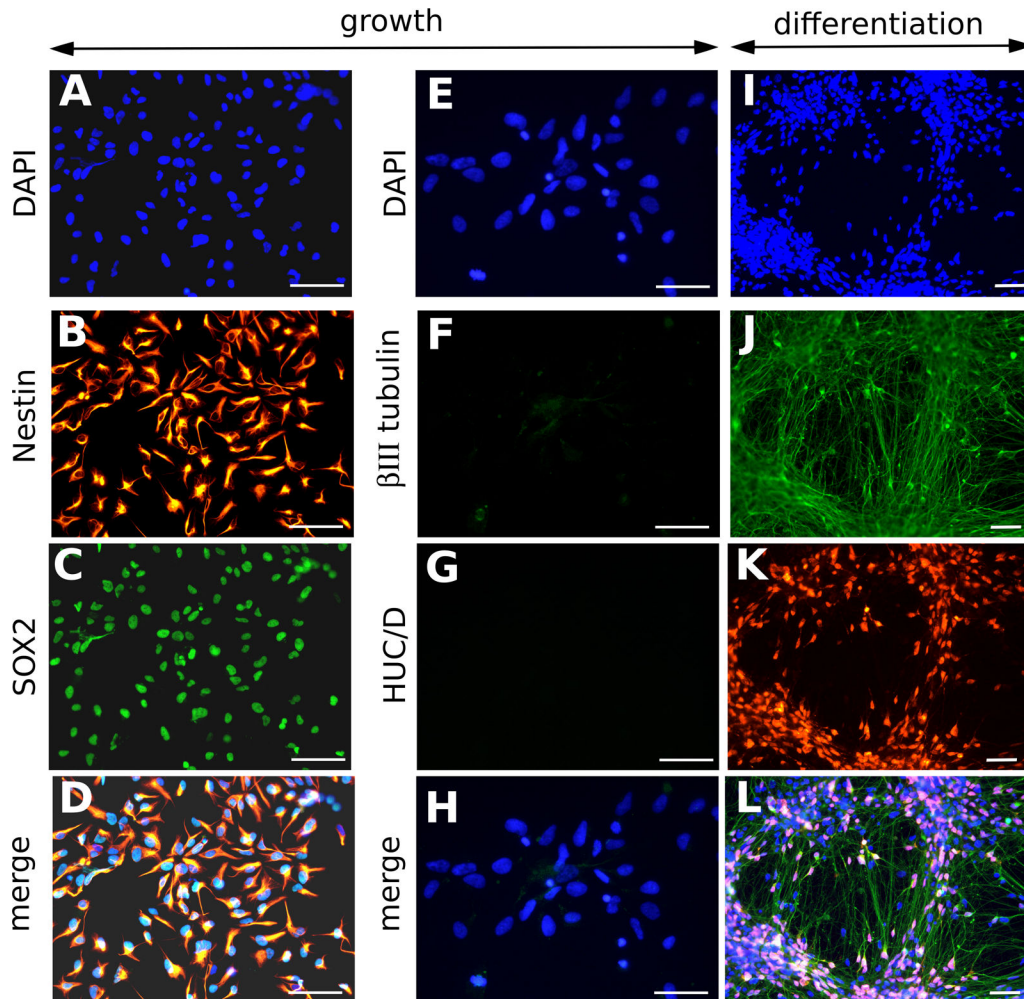


Fig 1. Characterization of neural stem cells from human ES cells (NSCs). Representative immunofluorescence analyses of NSCs cultured in growth medium (A-H) or in differentiation medium, 8 days after the onset of differentiation (I-L), using DAPI staining (A, E, I), or antibodies specific to Nestin (B), 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

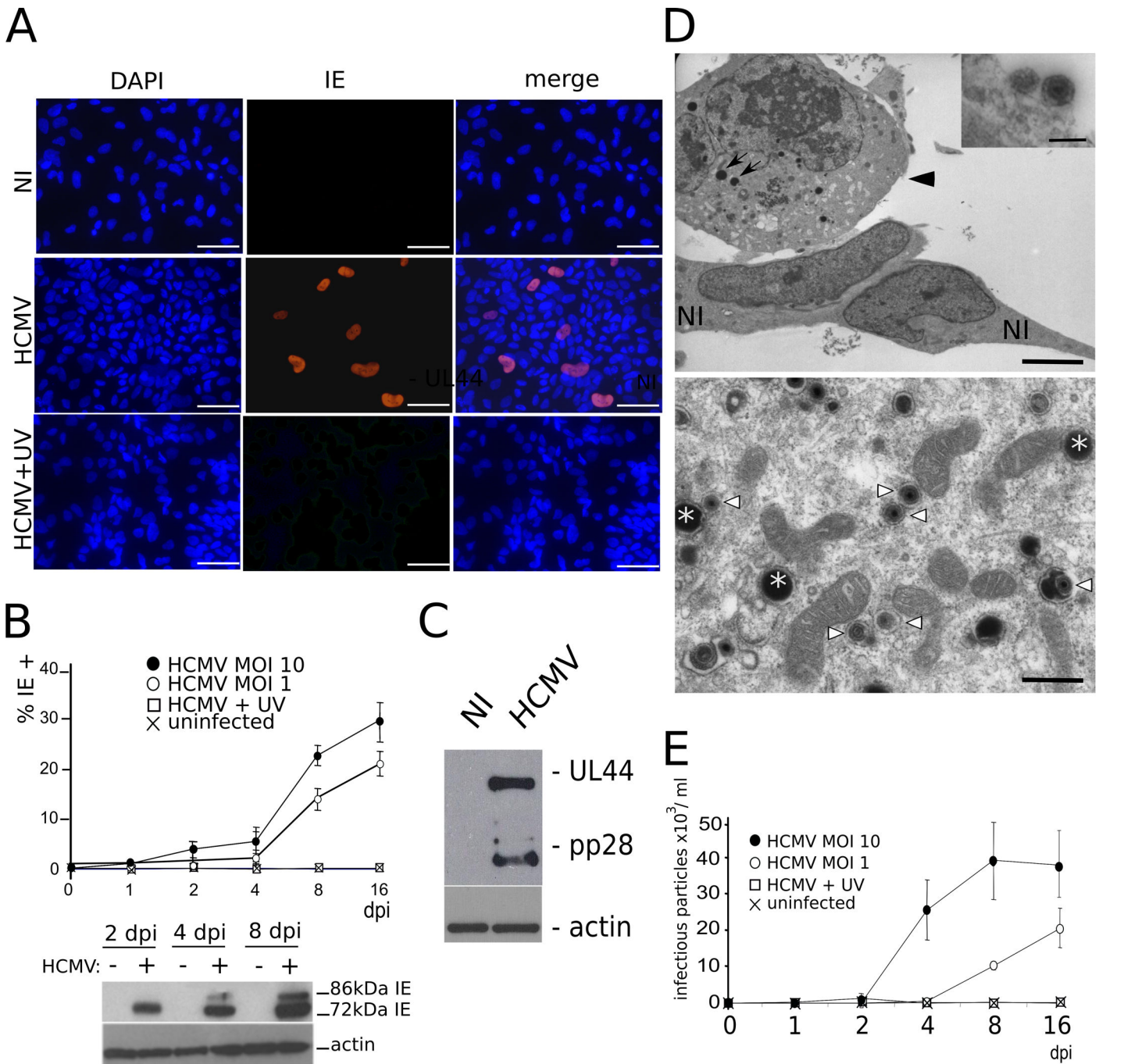


Fig 2. NSCs are permissive to HCMV infection. (A) Immunofluorescence analysis of NSCs infected by live (HCMV) or UV-irradiated (HCMV+UV) HCMV, or uninfected (NI), showing nuclear staining to the HCMV Immediate Early antigen (IE) two days post infection (dpi) at a multiplicity of infection (MOI) of 10. 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

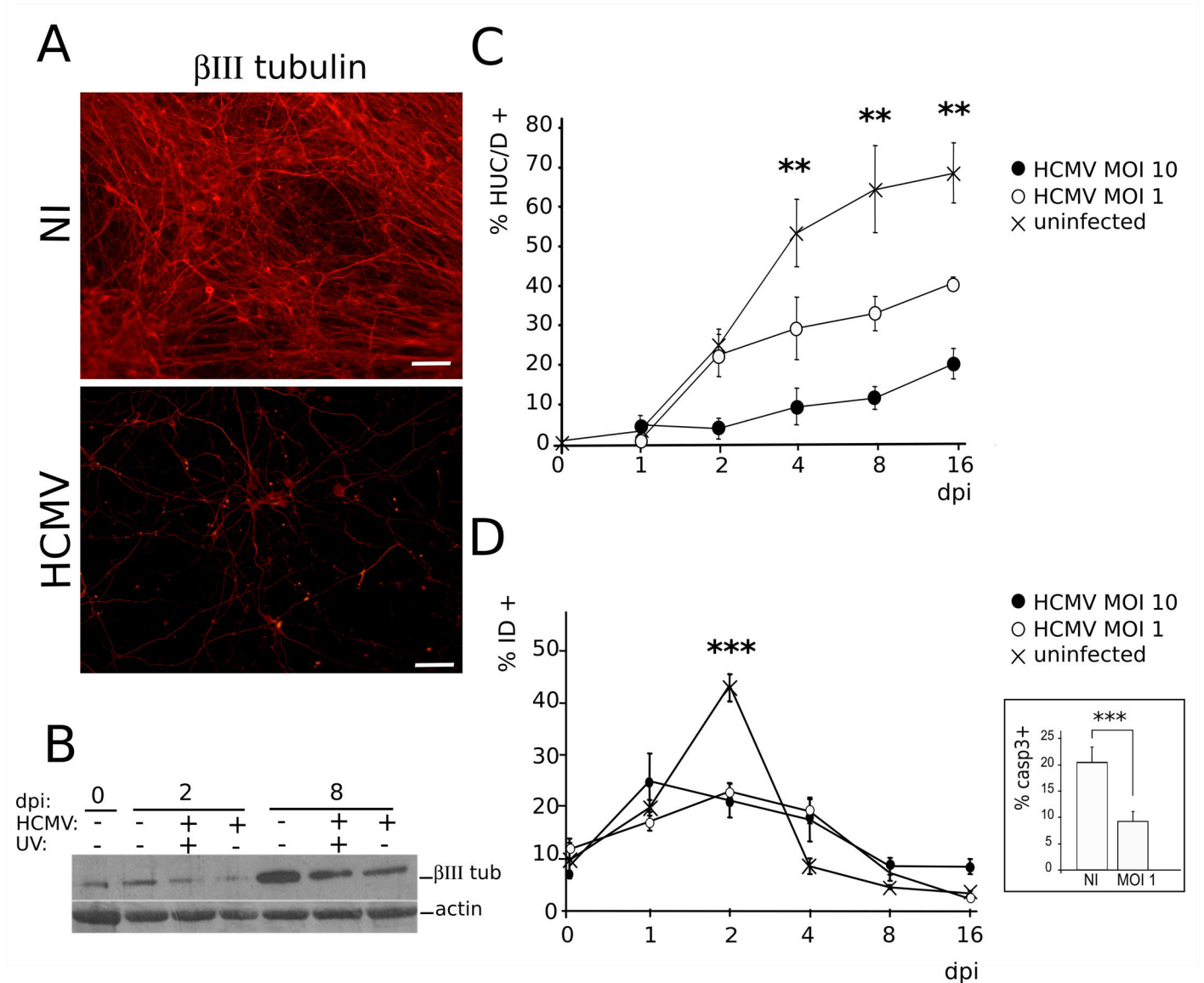


Fig 3. HCMV infection of NSCs impairs neurogenic differentiation in vitro. (A) Representative immunofluorescence analysis of NSCs infected by HCMV at a MOI of 10 (HCMV) and uninfected (NI) NSC cultures, 6 days after the onset of differentiation (i.e., 5 days post infection [dpi]) using a β III tubulin 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

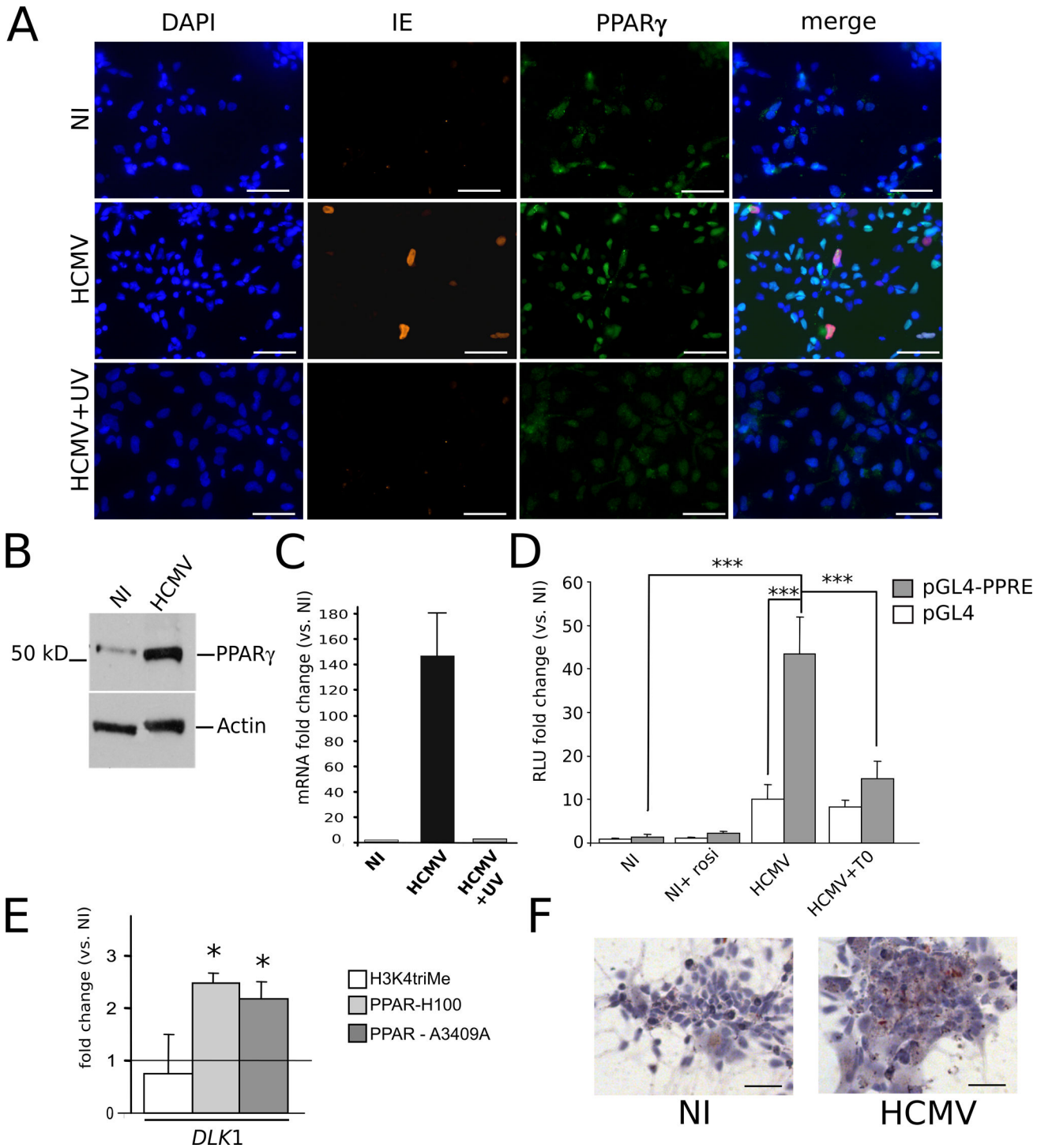


Fig 4. HCMV infection triggers the expression and activity of PPAR γ in NSCs. (A) Immunofluorescence analysis using antibodies specific to IE or PPAR γ showing strong nuclear staining of PPAR γ in NSCs infected with HCMV at a MOI of 10 (HCMV), as compared to non infected NSC cultures (NI) or NSCs infected 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

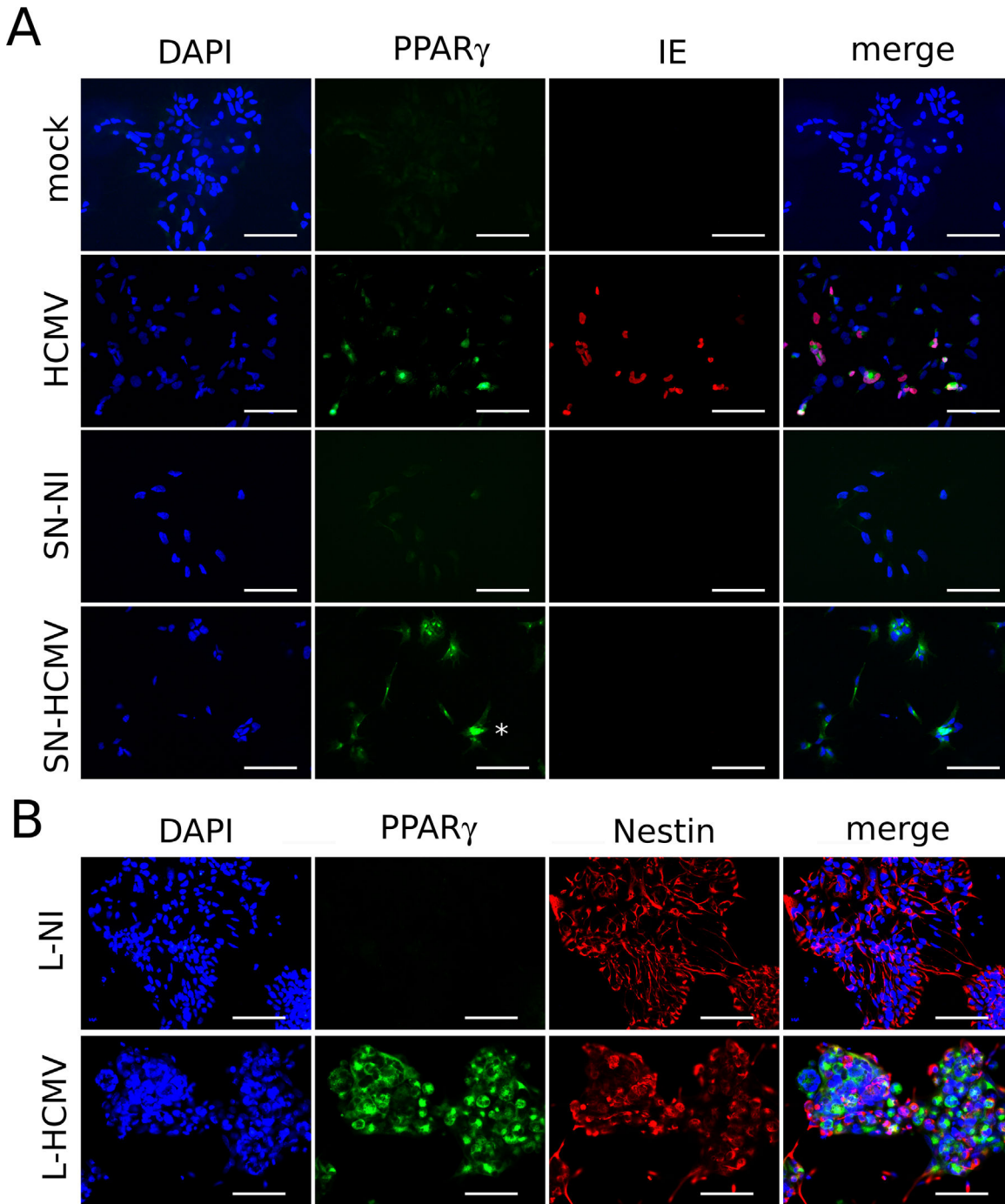


Fig 5. Soluble mediators from infected NSCs trigger the expression of PPAR γ in uninfected NSCs. (A) Immunofluorescence analysis using antibodies specific to IE or PPAR γ showing strong increase in PPAR γ levels in NSCs infected by HCMV (HCMV), or in uninfected NSCs treated with supernatants prepared 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

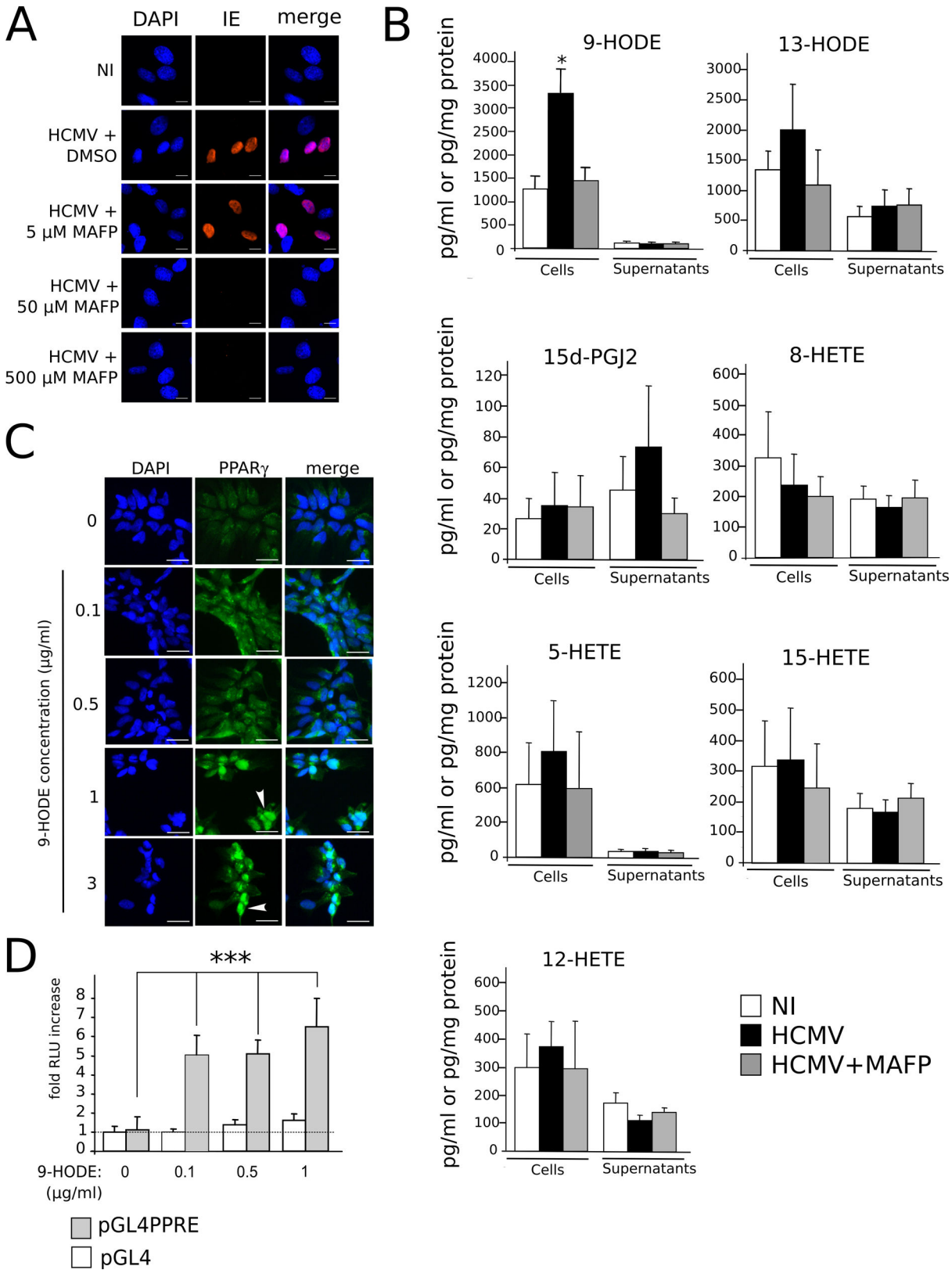


Fig 6. Increased production of PPAR γ agonist 9-HODE in infected NSCs. (A) Immunofluorescence analysis of IE expression, showing that treatment of the HCMV inoculum by the PLA₂ inhibitor MAFP impairs IE expression. NI: uninfected cells in medium containing 50 nM MAFP. (B) LC-MS/MS screening of

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

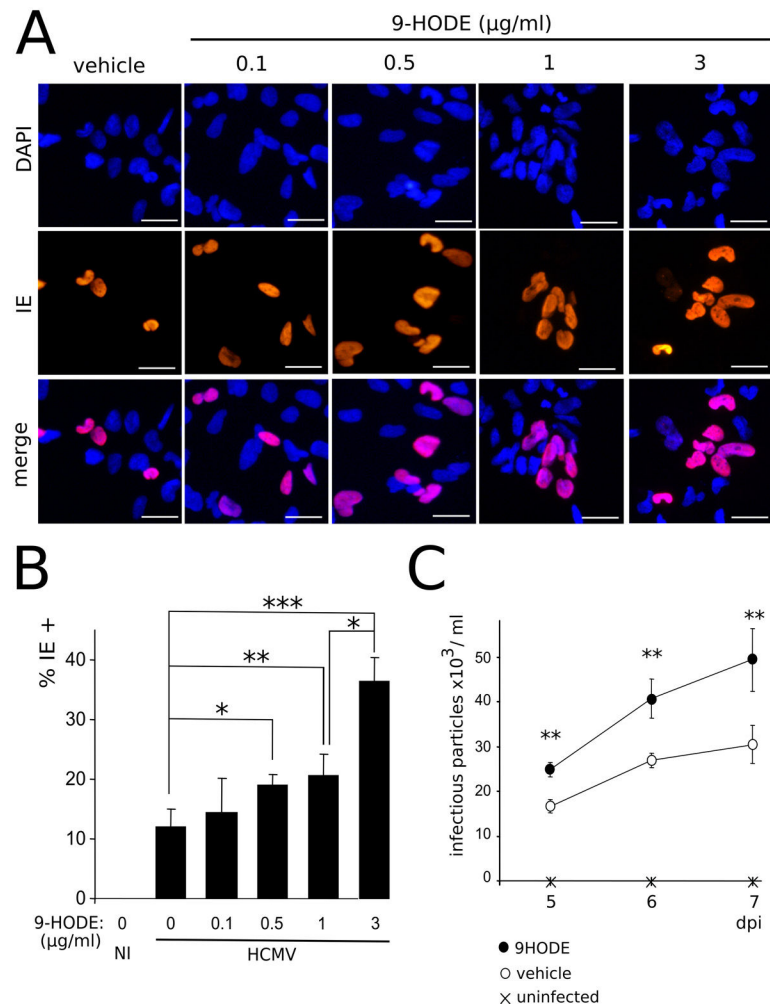


Fig 7. HCMV replication is enhanced by 9-HODE treatment. (A) Representative immunofluorescence results of IE expression in NSCs infected by HCMV at a MOI of 10 in the presence of increasing concentrations of 9-HODE or the vehicle, 48 h pi. (B) Immunofluorescence analysis showing increasing number over 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 $\mu\text{g/ml}$ 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 neurogenesis 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

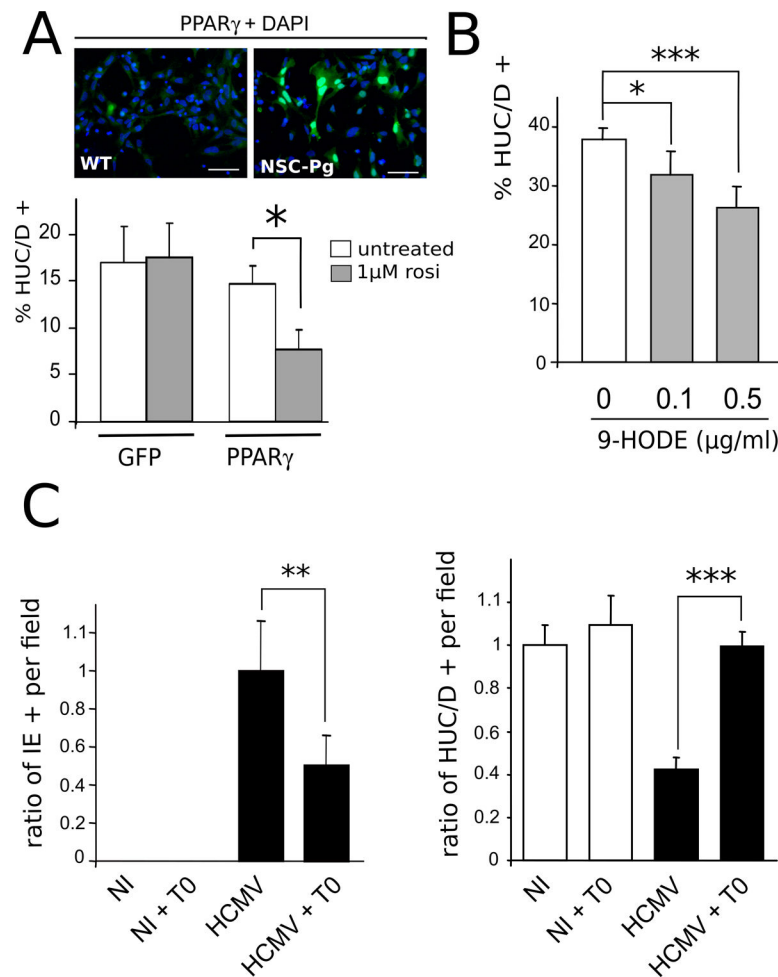


Fig 8. PPAR γ activity negatively regulates neurogenesis from NSCs. (A) Top: Representative immunofluorescence analysis of uninfected NSCs stably expressing PPAR γ (NSC-Pg), using an antibody specific to PPAR γ (green) (right). Wild type uninfected NSC cultures (WT) stained with the same PPAR γ antibody (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

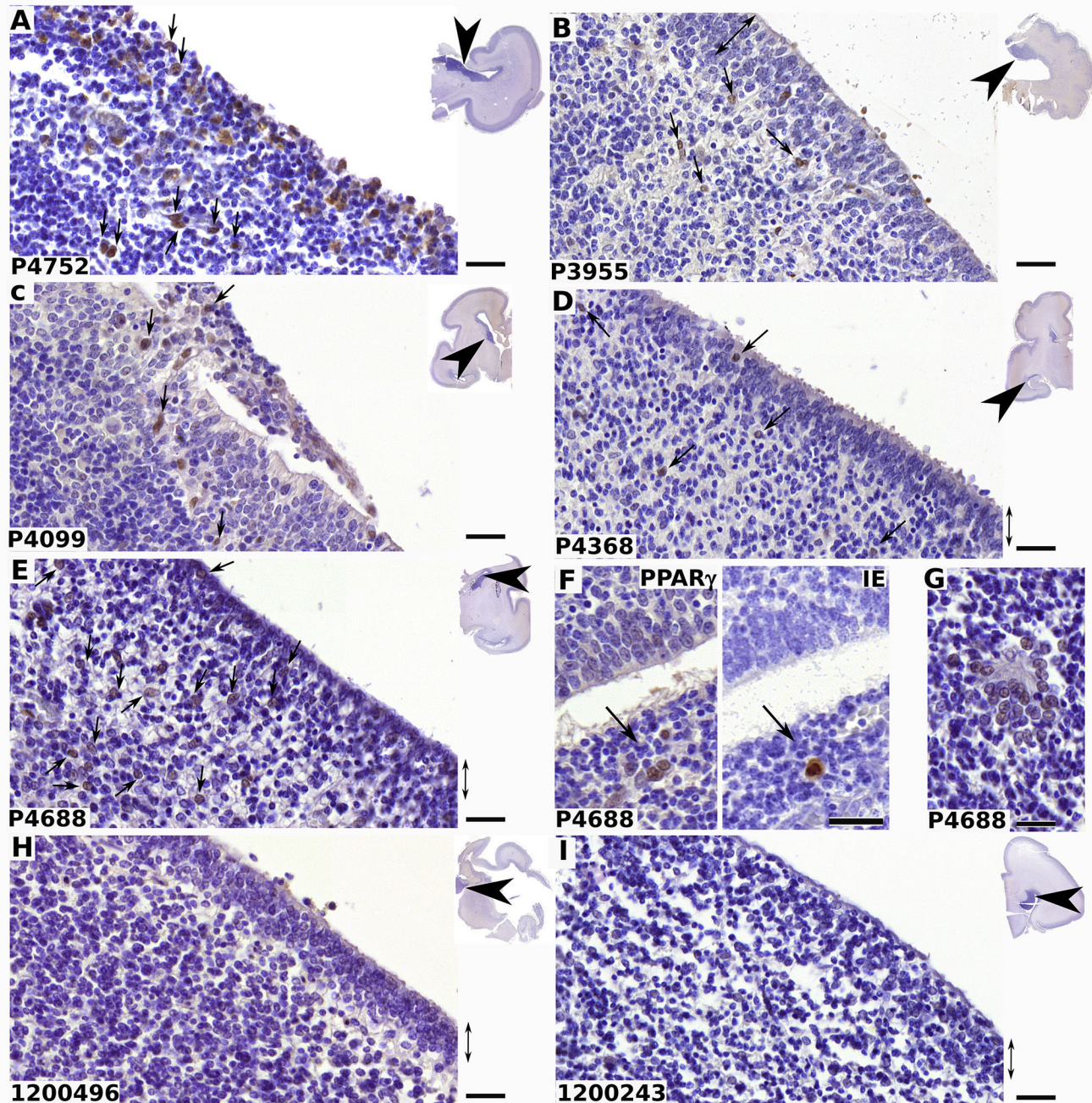


Fig 9. Nuclear PPAR γ expression in germinative zone of HCMV-infected human fetal brains. Shown are representative results of immunohistological staining of brain sections from fetuses infected by HCMV (A-G) or from controls (H, I) using antibodies against PPAR γ (A-E; F, left; G-I) or IE (F, right). 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](#)).

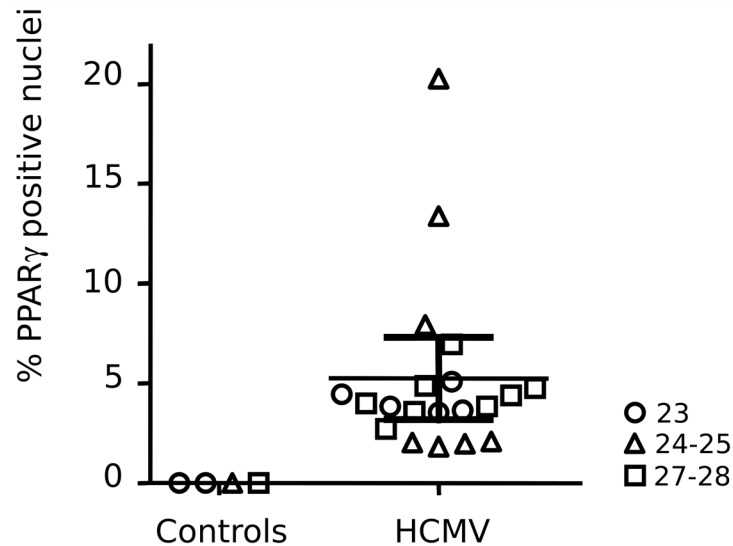


Fig 10. Summary of the immunohistological exploration of PPAR γ expression in HCMV fetal cases and controls. Each symbol represents the mean relative numbers of PPAR γ immunoreactive nuclei in optical fields (n = 6, magnification: x40) found in the brain germinal zone for each individual. Thin horizontal 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

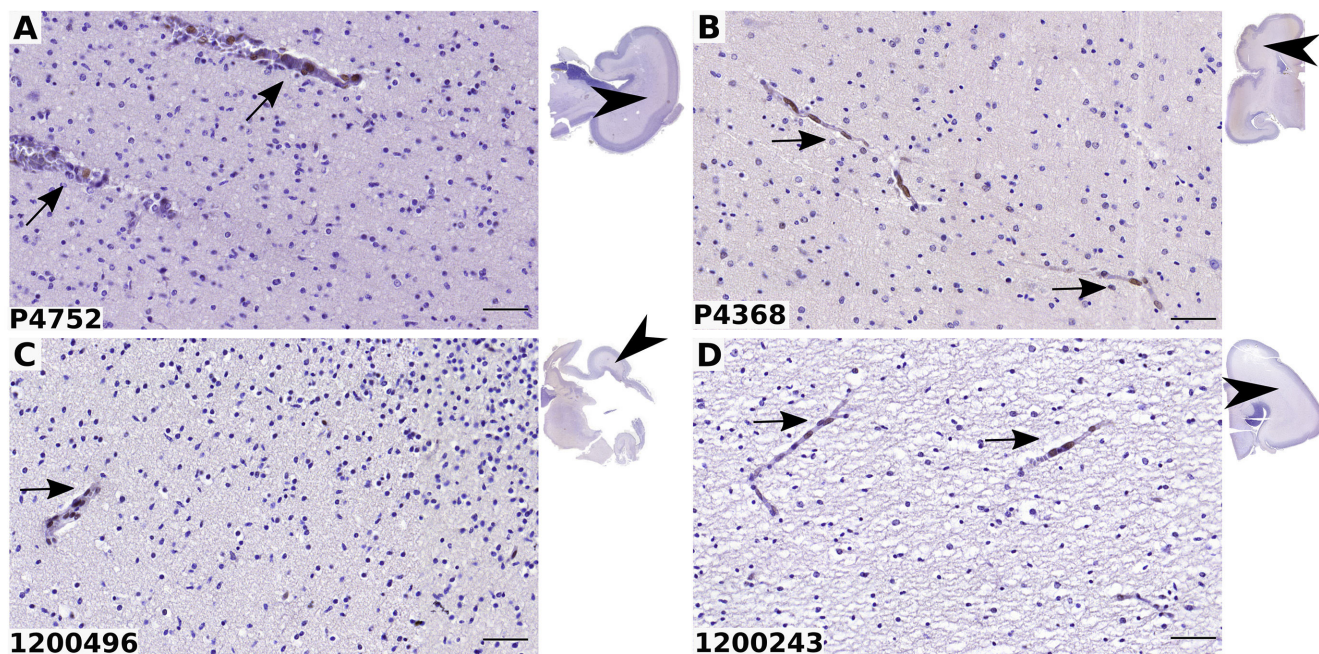


Fig 11. PPAR γ expression is not detected in the white matter of HCMV-infected fetal brains. Shown are representative results of immunohistological staining of brain sections from fetuses infected by HCMV (A, B) or from controls (C, D). The reference number of each donor is indicated at the bottom left 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

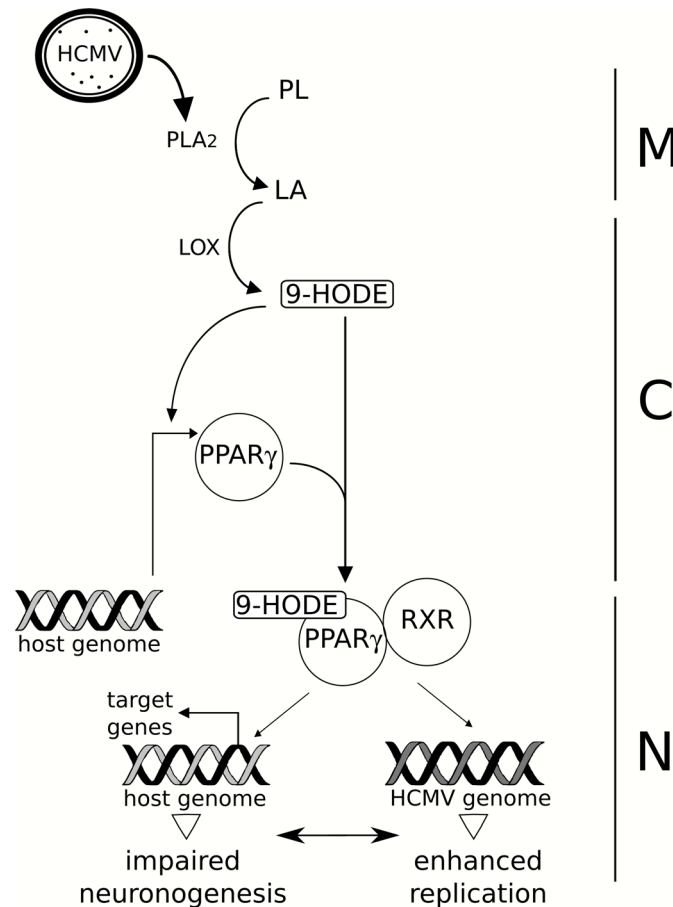


Fig 12. Proposed model for the role of PPAR γ during HCMV infection of NSCs. HCMV particles (HCMV) carry onboarded a cell-derived packaged cPLA2 (oPLA2, dots), which catalyzes the release of linoleic acid (LA) from host membrane phospholipids (PL) upon infection. LA undergoes oxidation driven by 15-lipoxygenase (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 neuronogenesis 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/).

Article 5

Epuisement de la réponse immunitaire innée et adaptative dans le cerveau fœtal infecté par le HCMV

Lors de l'infection congénitale à CMV, l'atteinte cérébrale fait toute la gravité du pronostic fœtal (253,336). Les atteintes cérébrales peuvent être soit majeures (microcéphalie, ventriculomégalie, polymicrogyrie, nécroses...) soit mineures (vascularites, épendymites...) (253). Une IMG est souvent proposée après la détection d'anomalie cérébrale chez un fœtus infecté. La physiopathologie de l'atteinte du cerveau fœtal et notamment les rôles respectifs de la multiplication virale locale et de la réponse immunitaire locale sont mal connus. Pourtant les données sur ce sujet sont importantes pour définir de futures stratégies thérapeutiques de l'infection fœtale. Quelques études se sont attachées à décrire le rôle de l'immunité dans les cerveaux de souris infectées par le MCMV (272,274,276,337,338) mais seulement 2 études ont été réalisées sur l'immunité dans les cerveaux humains fœtaux infectés par le HCMV (266,275). Ces 2 études ont rapporté la présence de lymphocytes CD8+, CD3+ et de plasmocytes, les CD8 étaient retrouvés en quantité supérieure dans les cerveaux les plus sévèrement atteints et où la multiplication virale était la plus importante (266,275). Il a également été montré que les populations de T CD4 ne semblaient pas être un élément majeur dans les cerveaux infectés par le CMV (contrairement au lymphocyte TCD8) aussi bien chez l'Homme que chez la souris (274,275). La réponse innée n'a pas été étudiée dans les cerveaux humains, mais les études chez la souris rapportent la présence d'une réponse des cellules NK (272) en présence de MCMV. Par ailleurs, le tropisme du HCMV pour les cellules du cerveau fœtal a été étudié in vivo que chez l'animal ou in vitro dans des cultures de lignées neuronales ou dans des cellules progénitrices humaines isolées de cerveaux fœtaux ou de nouveau-nés. Seule une étude en immunohistochimie s'est attachée à analyser l'association entre multiplication du HCMV et cellules neuronales retrouvant des doubles marquages entre HCMV et tous les types de cellules neuronales (266). Dans cette étude le niveau de réplication dans chaque type cellulaire n'avait pas été étudié.

Objectifs : Dans cette étude notre objectif était double : 1) d'une part de mesurer la réponse immunitaire innée et adaptative dans des cerveaux fœtaux infectés afin de les mettre en relation avec le niveau de multiplication virale et la sévérité de l'atteinte cérébrale. Afin de quantifier avec le plus d'exactitude possible le niveau des réactions immunitaires nous avons profité du développement des techniques d'analyse quantitative d'image. 2) d'autre part d'étudier le tropisme cellulaire du CMV in vivo dans les cellules neuronales. A cette fin nous

avons mis au point une technique de dissociation et de tri des cellules neuronales par cytométrie de flux à partir de biopsies de cerveaux fœtaux.

Population et Méthodes : Les échantillons de cerveaux fœtaux étudiés provenaient d'autopsies après IMG pour infection fœtale à CMV. 26 échantillons (21 cas et 5 témoins non infectés) de cerveaux inclus en paraffine entre 1997 et 2012 ont été étudiés en histochimie. 10 biopsies de cerveaux (6 cas et 4 témoins non infectés) obtenues au décours d'autopsies réalisées entre 2013 et 2016 ont été étudiées en cytométrie de flux.

Les cas ont été classés en 2 groupes en fonction des aspects macroscopiques et microscopiques entre sévèrement atteints et modérément atteints. Les résultats ont été comparés entre les 2 groupes et avec les témoins non infectés.

Dans la population de cerveaux inclus, la réponse immunitaire (NK, CD8, CD3, CD20 et plasmocytaires) ainsi que l'expression de PD-1 ont été mesurées par histologie suivie d'analyse quantitative d'image permettant de calculer des densités moyennes de marquage pour chaque échantillon. La multiplication virale a été évaluée par histologie ainsi que l'expression du récepteur NKG2C et PD-L1.

Dans la population de biopsies cérébrales, les différentes cellules du cerveau fœtal ont été séparées et triées par cytométrie de flux après marquage par des anticorps spécifiques de chaque type cellulaire. Des PCR CMV quantitatives ont été réalisées dans les différentes fractions.

Résultats : Les cellules CMV+, CD3+ et CD8+ ainsi que les plasmocytes ont été préférentiellement retrouvés dans les zones périventriculaires et plus particulièrement dans les zones germinatives. Les cellules NK étaient localisées uniquement dans les zones périventriculaires. Dans les cerveaux les plus sévèrement atteints, les cellules CD3+ et CD8+ avaient une répartition plus diffuse dans le parenchyme que dans les cas modérés. La présence de cellules NK p46+ a été mise en évidence dans les cerveaux infectés ainsi que celle du clone NKG2C.

Les densités de marquage de la multiplication virale des réponses immunitaires innées (NK) et adaptative (CD3, CD8, plasmocytes) étaient significativement plus élevées dans les cerveaux les plus sévèrement atteints ($p=0,03$) que dans les cas modérés $p=0,03$, $p=0,02$, $p=0,01$ et $p=0,007$ respectivement.

Nous avons mis en évidence un marquage PD-1 et PD-L1 dans les cerveaux atteints (sévéres ou modérés) mais pas dans les témoins. PD-1 et PD-L1 était préférentiellement détectés dans

les zones périventriculaires et parfois de façon diffuse dans le parenchyme cérébral. La répartition de marquage de PD-1 et PD-L1 était similaire à celle de l'immunomarquage des lymphocytes T CD8. Nous avons confirmé par la suite, par cytométrie de flux réalisée dans un échantillon de cerveau sévèrement atteint, que 96% des cellules CD8+, 90% par des populations de lymphocytes B (CD20+ et CD19+) et 71% des cellules NK (CD56+) exprimaient PD-1. De plus, la densité de l'immunomarquage PD-1 était significativement plus importante dans les cerveaux les plus sévèrement atteints que dans les cas modérés ($p = 0,001$).

Une réplication virale a été mise en évidence dans les 3 types de cellules neuronales (cellules souches, astrocytes et neurones) séparées par cytométrie de flux. La réplication virale était présente principalement dans les astrocytes (dans 60% de nos cas) mais aussi dans les cellules souches (20%) et les neurones (40%). Le niveau de charge virale retrouvée dans les astrocytes était plus élevé que dans les 2 autres types de cellules neuronales.

Discussion / Conclusion : Le paradoxe apparent de la concomitance d'une réponse immunitaire quantitativement importante avec une multiplication virale élevée dans les cerveaux les plus atteints, nous a fait rechercher un potentiel épuisement immunitaire en mesurant l'expression du complexe PD-1/ PD-L1. En effet, il a été rapporté que les cellules immunitaires et notamment les lymphocytes T CD8 pouvaient subir un phénomène d'épuisement dans les infections virales chroniques (VIH, hépatite C, tuberculose...) (189,339–341). De plus, une étude a mis en évidence un phénomène d'épuisement de la réponse des TCD8 (et TCD4) du sang circulant dans l'infection congénitale à CMV (183). Le marqueur PD-1 exprimé sur les lymphocytes activés a un rôle de régulation négative sur l'activité des lymphocytes et de la production de cytokines. Le complexe PD-1/ PD-L1 est ainsi devenu un marqueur de l'épuisement des cellules immunes (189–191,340,342). Dans notre étude, l'expression de PD-1 était essentiellement associée aux cellules CD8+ et aux lymphocytes B et PD-1 était surexprimé dans les cerveaux les plus sévèrement atteints soulignant le rôle important de cet épuisement des CD8 dans la physiopathologie de l'atteinte cérébrale. Par ailleurs nous avons pu montrer qu'il existe une réponse immunitaire innée dans les cerveaux infectés avec présence de cellules NK activées car exprimant le marqueur p46, cette réponse NK était associée à une expansion du clone NKG2C typiquement associé à l'infection à HCMV. La réponse NK était significativement plus élevée dans les cerveaux les plus atteints et corrélée à la multiplication virale suggérant que cette réponse NK n'est pas ou que partiellement efficace. L'expression de PD-1 par une majorité de cellules NK évoque aussi un épuisement de ces cellules.

L'ensemble de ces résultats suggère donc un épuisement de la réponse immunitaire adaptative mais aussi innée dans les cerveaux fœtaux les plus sévèrement atteints. Ainsi en l'absence de tout contrôle de la multiplication virale, le virus pourrait continuer à infecter de nouvelles cellules cérébrales notamment les astrocytes qui semblent le contingent cellulaire le plus susceptible *in vivo*. L'infection des astrocytes pourrait altérer leur fonction de support et d'intégration synaptique et provoquer les lésions cérébrales associées à l'infection congénitale à HCMV.

Exhaustion of adaptive and innate immune responses in fetal HCMV infected brains

Sellier Y^{a,b,c}, Marliot F^{c,d}, Stirnemann J^{a,b,c}, Bessiere B^{c,e}, Ferechte R^{c,e}, Candon Sophie^{c,f}, Bonniere M^e, Guilleminot T^{b,c,g}, Olivier Pellé^h, Corinne Cordier^h, Haicheur N^d, Pagès F^{c,d}, Ville Y^{a,b,c}, Leruez-Ville M^{b,c,g}*

^aDépartement d'obstétrique et de médecine fœtale, Hôpital Necker-Enfants malades, AP-HP, Paris, France

^bEA 7328, Paris, France

^cUniversité Paris Descartes, Sorbonne Paris Cité, Paris, France

^dINSERM U872, équipe 15. Laboratoire d'immunologie, plateforme d'immuno-monitoring, Hôpital européen Georges-Pompidou, AP-HP, Paris, France.

^eDépartement d'histologie, d'embryologie et de cytogénétique, Hôpital Necker-Enfants malades, AP-HP, Paris, France.

^fInstitut National de la Santé et de la Recherche Médicale (INSERM) U1151, France; Centre national de la recherche scientifique (CNRS) UMR 8253, Institut Necker-Enfants Malades, 75015 Paris, France.

^gLaboratoire de Microbiologie Clinique, Hôpital Necker-E.M., National Reference Center for Cytomegalovirus-Associated Laboratory, Paris 75015, France.

^hInstitut National de la Santé et de la Recherche Médicale, US24, 75015 Paris, France; Centre National de la Recherche Scientifique, UMS3633, 75015 Paris, France

*Corresponding author:

E-mail: marianne.leruez@aphp.fr

Abstract

Cytomegalovirus (CMV) is the commonest cause of congenital infection and is a major cause of neurological disabilities. The pathophysiology of CMV brain injury is not completely understood and particularly the balance between viral multiplication and immune responses in fetal infected brain is not well characterized. The aim of this work was to compare the magnitude of viral multiplication and immune responses in infected fetal brains between cases with severely affected brains and cases with moderately affected ones. The magnitude of innate and adaptive immune responses in brains was measured by immunocytochemistry followed by quantitative imaging. Viral replication was measured by PCR in the different neuronal cell types after separation of these cells by flow cytometry. The densities of CD3+ cells, CD8+ cells, plasma cells and NK cells as well as the densities of CMV+ cells were significantly higher in the more severe affected brains. PD-1 and its receptor PD-L1 were expressed in all infected brains and not in controls, moreover PD-1 expression was found significantly higher in the most affected brains. PD-1 expression was found on 96% of all CD8+ cells and on 90% of CD19+CD20+ cells in double labeling by flow cytometry suggesting a massive T and B cells exhaustion in severely affected brains. Although, brain NK cells expressed the activator receptor p46 and the CMV specific NKG2C receptor, at least part of them also expressed PD-1 suggesting that NK cells might also be partly exhausted. CMV replication was detected in all neural cell types (astrocytes, neurons and stem cells) but the frequency and level of CMV DNA was the highest in astrocytes suggesting that this cell type might be a privileged site for CMV replication in human fetal brains. These results indicate that in some cases of fetal infection, although brain immune cells are present at a high level, they remain inefficient to control viral multiplication and CMV is let to replicate in neural cells mainly astrocytes leading to severe brain damage. While in other cases, it seems that a balance between viral multiplication and immune responses arise which allows partial control of viral replication and less or no damage in the fetal brain.

Authors' summary

CMV is the commonest cause of congenital infection and can result in significant neonatal morbidity and neurological disabilities. The birth prevalence of congenital CMV is estimated at 0.7% worldwide, and 10 to 15% of these neonates present with severe cerebral symptoms. The aim of this study was to study viral and immune correlates of these severe fetal brain infections. We took advantage of the recent development of quantitative imaging analysis to accurately assess the magnitude of CMV multiplication and innate and adaptive immune responses in fetal brains collected after termination of pregnancy. The data on CMV target cells in human fetal brain are partially conflicting probably because they derived from results obtained in the mouse model or from in vitro studies done on neuronal cells lines or on human neuronal cells precursors. We developed a technique to separate cells types from fresh fetal brain biopsies obtained during autopsy in order to better study CMV cell tropism or other markers directly from fetal brain naturally infected during pregnancy. We found that in vivo, although CMV replication was detected in astrocytes, neurons and stem cells the main target for CMV replication seemed to be the astrocytes. Moreover, we found that high CMV multiplication in severely affected brains was the consequence or the trigger or both of exhausted adaptive and innate immune responses. This emphasizes the need for the development of antiviral therapy to treat CMV infected fetuses in order to avoid the constitution of severe brain lesions.

INTRODUCTION

Cytomegalovirus (CMV) congenital infection affects 0.7% of live births and is the leading cause of congenital neurological handicaps of infectious origin (1–3). The fetus may be infected after a maternal primary infection or after a maternal secondary infection. In both cases, the placenta is infected following maternal viremia. The placenta, where the virus replicates, acts both as a barrier against CMV but also as a reservoir which may release the

virus into the fetal circulation leading to fetal infection. Fetal infection is a systemic one and viral replication can be demonstrated in many organs such as the liver, the spleen, the kidney, the heart and the brain. After acute fetal infection, the virus is not cleared and the infection remains chronically active. Congenitally infected infants will exhibit persistent CMV replication in blood, saliva and urine throughout their first years of life. Although all infected fetuses have persistent replication, albeit at different levels, only 10 to 15% will develop severe CMV disease involving the brain. Abnormalities of the infected fetal brain are either severe such as microcephaly, ventriculomegaly, abnormal gyration, calcifications, necrosis and white matter abnormalities (4–7), or milder such as vasculitis in the thalami and basal ganglia or sub-ependymal cysts. Severe cerebral lesions have been consistently correlated in the literature to a dismal prognosis and milder cerebral lesions remain with an uncertain prognosis (8). Therefore, the detection of brain anomalies in an infected fetus usually leads to termination of pregnancy (TOP).

The understanding of the pathogenesis of symptomatic congenital CMV infection in human brain is limited. Specifically, the role of the immune system and of the inflammatory response in the pathogenesis of brain injuries is not known. In situ virological and immunological correlates of CMV infected human fetal brain related injuries have been scarcely investigated. However, two histopathological studies of human infected fetuses provided evidence that CD8+ cells constitute the major immune cells contingent followed by plasma cells (9,10). In these studies, mild brain damage was associated with low tissue viral loads and weak T cells responses when severely affected brains exhibited high viral loads contrasting with high T cells infiltration (9,10). Although, in both studies granzyme B-expressing lymphocytes were identified, these results raise the question of why the fetal cellular CD8+ immune response has such a limited control of viral replication in the fetal brain. Further studies are therefore needed to increase the knowledge on fetal immune responses in the fetal brain and their consequences. Indeed, this could be important for both prenatal and postnatal management of

these infections. Neonatal antiviral treatment with ganciclovir is recommended for the prevention of long-term neurological sequelae in symptomatic neonates (11,12) and aciclovir prenatal treatment of women carrying a fetus presenting with mild ultrasound symptoms has demonstrated an efficacy to prevent the birth of a symptomatic neonate (13). If it is demonstrated that the inflammatory response to CMV plays a role in the development of fetal brain lesions, anti-inflammatory agents might be discussed to complement antiviral strategy.

The aim of our study was to compare in situ virological and immunological correlates between human fetal brains samples severely affected, moderately affected and uninfected. The results of this study indicate that although there was a significantly higher level of innate and adaptive immune cells in severely affected fetal brains, CMV replication remained high and most of these immune cells (CD8+, NK cells, CD19+ and CD20+ cells) displayed a high level of PD-1 a recognize marker of cells exhaustion. The proportion of T cells responses was significantly higher in severe cases than in milder cases suggesting that this phenomenon plays a major role in the pathogenicity of fetal brain lesions.

RESULTS

Detection and quantification of immune cells in infected fetal brains by immunohistochemistry

We performed immunohistochemistry to detect and quantify CMV+ cells, innate immune cells (NK cells) and adaptive immune cells (CD3+, CD8+, CD20+, plasma cells) on all fetal brain samples from the retrospective cohort (21 cases and 5 controls). An example of the immunohistochemistry staining obtained with the 6 antibodies is shown in **Fig 1A**.

The localization of immunostained cells was heterogeneous in brain samples as appreciated on scanned slides (**Fig 2**). CMV + cells were found in the cortical zone and in the white matter but were preferentially localized in the ventricular zones and the germinative zones in

all cases whatever the cerebral severity. Plasma-cells were preferentially found in the peri-ventricular and germinative zones but also in the white matter and cerebral cortex whereas NK cells were found only in the peri-ventricular and germinative zones. Plasma cells and NK cells were not found in controls. CD20 immunostaining was also found preferentially in the peri-ventricular zone in all cases. In severely affected brains CD3+ and CD8+ immunostaining was diffuse to the whole cerebral parenchyma (**Fig 2A**) whereas in moderately affected brains the staining was preferentially found in the ventricular and germinative zones (**Fig 2B**)

The distribution of CD3+ immunostaining density was also heterogeneous (**S1 Fig**). Because the localization of CD8+ and CD3+ immunostaining was diffuse, we looked if the staining densities were homogeneous in the whole slide or not in the 3 groups of samples. The densities of CD3+ cells and CD8+ cells were heterogeneous among the brains for severe and moderate cases. The highest densities were localized in the periventricular zone and particularly in the germinative zones and in the temporal horn of the lateral ventricle. CD3+ cells and CD8+ cells were very rare in controls but also localized in the periventricular zone. In severely affected brains CD3+ cells and CD8+ cells were found in the whole parenchyma. The mean brain immunostaining densities were compared between groups. Viral multiplication in brain (density of CMV+ cells) was significantly higher in severely affected brains than in moderately affected ones ($p=0.03$) (**Fig 3**). Densities of immune cells staining were significantly higher in severe cases than in moderate cases and in controls for NK cells ($p=0.02$; $p=0.0007$ respectively); CD3+ cells ($p=0.01$; $p=0.0001$); CD8+ cells ($p=0.014$; $p=0.0002$) and plasma cells ($p=0.007$; $p=0.0032$) but were similar for CD20 ($p=0.6$; $p=0.93$) (**Fig 3 and S2 Fig**). There was no significant difference in immune cells staining densities between moderate cases and controls.

A principal component analysis was realized to bring out patterns between densities of CMV+ cells, adaptive responses (CD3+ cells, CD8+ cells and plasma cells) and PD-1 according to

cerebral severity groups (A, B or control). A strong link was found between viral multiplication, immune responses, PD-1 and cerebral severity (**Fig 4**).

Finally, since the presence of activated NK cells was demonstrated by positive NKp46 immunostaining, we checked for the presence of NKG2C cells that have been associated with human CMV infection. NKG2C immunostaining was negative in controls whereas NKG2C receptor staining was identified in 8 of the 11 severe cases and in only 1 of the 7 moderate cerebral severity cases, ($p=0.049$, OR 13.2 (IC95% [1.002; 819.6]), Fischer test exact).

Fig 1. Immunohistochemistry results, in one severely affected brain sample (case number 7). DAB-chromogen was used and slides were scanned with Nanozoomer 2.0 HT Digital slide scanner (A) Immunostaining of CMV+ cells and CD3+, CD8+, CD20+, plasma cells and NK cells (NKp46+), (B) immunostaining of NKG2C+ cells and PD-1 and PD-L1.

Fig 2. Examples of the repartition of CMV+ cells and of immune cells. (A) In one brain sample severely affected (group A), successive cuts, case n°8 (B) In one brain sample moderately affected (group B) successive cuts, case n°17.

Fig 3. Mean immunostaining densities according to brain severity: severe (group A), moderate (group B) and controls. (A) Mean densities of CMV+ cells (B_{1.5}) and of immune cells (CD3+, CD8+, CD20+, plasma cells, NKp46+) (C) Mean densities of PD-1 immunostaining. Each case from group A (severely affected) is represented by a specific color dot. * $p<0.05$, ** $p<0.01$, *** $p<0.001$. Kruskal-Wallis test was used with Dunn's Multiple Comparison's Test.

Fig 4. Principal component analysis (PCA) of the adaptive immune response (CD3, CD8, plasma cells) and viral multiplication (CMV) in brain according to cerebral severity A

(severe) / **B (moderate)**. Severe cases are represented by red dots, moderate cases by yellow dots and controls by blue dots.

Detection and quantification of PD-1 and its receptor PD-L1 in infected fetal brains by immunochemistry

The coexistence of high immune cells densities and high CMV densities in severely affected brains raise the question of the efficacy of these immune cells. To test for the functionality of immune cells, we realized PD-1 labeling in all samples (**Fig 1B**), indeed exhausted immune cells expressed high levels of inhibitory receptors of which PD-1 is the most characteristic. In controls, no PD-1 expression was detected whereas PD-1 expression was evidenced in all cases. In moderately affected brains, PD-1 was preferentially localized in the periventricular zones while in severely affected brains the PD-1 immuno-labelled cells were found in periventricular zones but also spread in the cerebral parenchyma mimicking the localization of CD8+ cells (**Fig 5**). The mean density of PD-1 staining was heterogeneous. The highest immunostaining density was found in periventricular zone in all cases (A or B). The PD-1 mean densities were significantly higher in severe cases (A) than in moderate cases or in controls ($p=0.001$; $p = 0.004$) (**Fig 3C**). The correlation between PD-1 and CD3 or CD8 was r^2 : 0.6391 and 0.5677 respectively (**Fig 4B**).

Then we searched for the presence of PD-L1 (**Fig 1B**), the receptor of PD-1, PD-L1 expression was found in all cases but not in controls. The localization of PD-L1 immunostaining was found in periventricular zones, cortical zone and white matter in the same area than PD-1 (**Fig 6**).

Fig 5. Example of the localization of PD-1, PD-L1 and CD8+ immunostaining. (A) In one brain sample severely affected (group A), case n°7. (B) In one brain sample moderately affected (group B), case n°17.

Fig 6. Examples of the localization of PD-1 and PD-L1 immunostaining in fetal brain.

PD-1 and PD-L1 immunostaining were co localized in: (1) The frontal horn of lateral ventricle (2) The white matter (3) The temporal horn of lateral ventricle.

Ratios between mean density of PD-1 expression and mean density of immune cells

For immune cells that were significantly increased in severely affected brains (CD3+ cells, CD8+ cells, NK cells and plasma cells), we calculated the ratios obtained between the mean density of PD-1 expression and the mean density of each immune cell types for each brain sample. These ratios were significantly higher in severely affected brains than in moderately affected ones for CD8+ cells and CD3+ cells ($p=0.0015$ and $p=0.005$ respectively) but were not significantly different between severity groups for NK cells and plasma cells ($p=0.08$ and $p=0.3$ respectively) (S3Fig).

Detection and cells' association of PD1 and PD-L1 expression in fresh biopsies of fetal infected brains by flow cytometry

To better identify which immune cells were expressing PD-1 in severe affected brains, we studied immune cells isolated from fresh biopsies by flow cytometry obtained from 1 fetus with a severely affected brain by flow cytometry. PD-1 expression was found in 96% of CD8+ cells, in 75% of CD19+ CD20- cells, in 90% CD19+CD20+ cells and in 71% of CD56+NK cells (Fig 7).

Fig 7. Double immunostaining PD-1/ immune cells (CD45+), by FACS LSR FORTRESSA SORP, in human fetal brain infected by HCMV, case n°32. PD-1 was detected in (1) 95% of CD8+ cells (2) 71% of NK CD56+ cells (3) 90% of CD20+ /CD19+ cells (4) and 75% of CD19+ /CD20- cells.

Detection and quantification of CMV DNA in different cerebral cell types sorted by flow cytometry in fresh biopsies of fetal infected brains

Six cells populations were separated by flow cytometry from 9 fresh brain biopsies (5 infected brains (3 severe cases and 2 moderate cases) and in 4 controls: immature astrocytes (nestin +/ GFAP+/ β III tubulin -), astrocytes (nestin-/ GFAP+/ β III tubulin -), neurons (nestine-/ GFAP-/ β III tubulin+), stem cells (nestine +/ GFAP -/ β III tubulin-) endothelial cells and leucocytes/leucocytes progenitors (CD34+/ CD45+). The proportion of neuronal cells was consistent to what would be expected in temporal and frontal areas since among all cells recovered in brains the median proportion of neurons, astrocytes and stem cells were 88 %, 6% and 3.5% respectively for cases versus 75.6%, 7.9% and 5.8% respectively for controls (14). CMV real time PCR was performed in each cells population in the 5 infected cases. CMV DNA was found in all cell types except immature astrocytes (**Table 1**). CMV DNA was found more often in the astrocytes (3 cases, 60%), then in the neurons (2 cases, 40%) and more rarely in stem cells (1 case, 20%). The CMV DNA loads were higher in astrocytes than in neurons. CMV DNA was also detected in CD45+ cells in 3 cases (60%) and in endothelial cells in 2 cases (40%).

Table 1. CMV DNA quantification in different cell types in infected human fetal brains

Case N°	Severity	Cell types	Number of cells/ fraction (FACS Aria III)	% of cell/fraction	CMV DNA Copies /10 ⁶ cells
	Group				
27	A	immature astrocytes	1,001	5.2	Indéctable
		mature astrocytes	543	2.9	13,000
		neurons	17,590	90.1	Indéctable
		stem cells	317	1.8	indetectable
28	A	immature astrocytes	109	0.8	indetectable
		mature astrocytes	643	4.5	indetectable
		neurons	12,939	91.1	800
		stem cells	514	3.6	6,000
29*	A	immature astrocytes	317	1.6	indetectable
		mature astrocytes	1,519	7.7	5,000
		neurons	17,470	88.6	indetectable
		stem cells	423	2.1	indetectable
30*	B	immature astrocytes	1,827	2.8	indetectable
		mature astrocytes	3,905	6.2	indetectable
		neurons	54,571	86.1	300
		stem cells	3,090	4.9	indetectable
31	B	immature astrocytes	1,422	9.3	indetectable
		mature astrocytes	5,947	39.1	3,000
		neurons	7,321	48.1	indetectable
		stem cells	525	3.5	indetectable
Control N°					
33		immature astrocytes	19,599	20.3	not appropriate
		mature astrocytes	7,597	7.9	not appropriate
		neurons	59,622	61.9	not appropriate
		stem cells	9,551	9.9	not appropriate
34		immature astrocytes	477	0.9	not appropriate
		mature astrocytes	543	1.1	not appropriate
		neurons	50,898	97.2	not appropriate
		stem cells	439	0.8	not appropriate
35		immature astrocytes	471	5.5	not appropriate
		mature astrocytes	828	9.7	not appropriate
		neurons	4,919	57.7	not appropriate
		stem cells	2,300	27.1	not appropriate
36		immature astrocytes	634	1	not appropriate
		mature astrocytes	4,809	7.8	not appropriate
		neurons	55,132	89.5	not appropriate
		stem cells	1,043	1.7	not appropriate

*Twins, A severely affected brain (group A), B moderately affected brain (group B)

Links between CMV multiplication and adaptive immune responses in placenta and the severity of brain lesions

We compared densities of CD3+, CD8+, plasma cells, CD20+ and CMV + cells obtained in placenta samples and in brain samples from cases 1 to 21 and from controls 22 to 26. Densities of CMV + cells in placenta samples from cases with severely affected brains were significantly higher than in placenta from cases with moderately affected brains ($p= 0.014$). Whereas there was a trend for high densities for CD3+, CD8+, plasma cells, and CD20+ in placenta in cases with a severely affected brain this difference was not significant than in cases with a moderately affected brain ($p=0.15$, $p=0.5$, $p=0.17$ and $p>0.99$ respectively) (**S4 Fig**)

DISCUSSION

In this study, we aimed to quantify viral multiplication and innate and adaptive immune responses in CMV infected fetal brains. Level of viral multiplication and immune responses were compared between brain samples with severe abnormalities and brain samples moderately affected. Fetal brain tissues were obtained from infected fetuses interrupted in the second trimester of pregnancy because of ultrasound abnormalities related to the infection. The study was based on histopathological analyses of retrospective cases using quantitative imaging to accurately assess the magnitude of the different immune cell responses. In parallel, to evidence co-expression of cells receptors and to study the level of CMV replication in different brain cell types, we used flow cytometry in fresh fetal brain biopsies obtained prospectively after termination of pregnancy for CMV fetal disease.

Innate response in infected fetal brain: NK cell responses

This is the first study to investigate the NK cell responses in human fetal infected brains. Detection of NK cells was done using a anti p46 monoclonal antibody, p46 + being an

activating receptor (15,16). NKp46+ cells would be able to mediate a cytotoxic response against a viral infection (16,17). NKp46+ cells were found in all infected brains but only localized in periventricular zones. The density of immuno-labelling was significantly higher in severe cerebral cases than in moderate cerebral cases and in controls ($p= 0.02$ and $p=0.07$ respectively). A very strong correlation between brain viral multiplication and cerebral presence of NKp46+ cells was found, suggesting that the presence of high viral loads triggers high effective NK cell responses. However, in one severely affected brain sample studied by flow cytometry, 71% of CD56+ NK cells were co-expressing PD-1 suggesting that part of the NK cells present in severely infected brains are exhausted. There is recent evidence suggesting that much like other lymphocyte populations NK cells can become functionally exhausted in chronic infection. For example, exhaustion has been reported in NK cells from lymph nodes of SIV-infected rhesus macaques that are continuously activated by virus replication (18). Finally, as HCMV infection has been associated with an expansion of NKG2C + NK cells in both postnatal and prenatal infection (19–24), we looked for NKG2C + expression in infected brains. NKG2C + cells were evidenced in brain tissues and these cells were localized in the periventricular zones as were NKp46+ cells. The number of NKG2C+ NK cells was low and they were more often found in severe affected brains (72%) than in moderately affected ones (14%) ($p=0.049$). This confirms previous results obtained in infected neonates showing a more frequent and higher expansion of circulating NKG2C+ NK cells in symptomatic neonates compared to asymptomatic ones (25,26). A complete deletion of the *NKG2C* gene has been reported in European populations with around 4% homozygosis and 30% heterozygosis (27) and in one study homozygous children had higher number of circulating NKG2C+ NK cells as compared to heterozygous children(25). This suggests that NKG2C has an impact on NK cells homeostasis in fetal life but is not an essential determinant. Indeed, very recently a crucial role of CD2 co-stimulation in NK cells responses was revealed in NKG2C- NK cells (28).

Adaptive immune response in infected fetal brains: T and B cells responses

T cells responses

The magnitudes of CD3+ cells and CD8+ cells responses were significantly higher in severely affected brains than in moderately affected ones ($p=0.01$ and $p=0.014$ respectively) ($p<0.001$) and in controls ($p=0.0001$ and $p=0.0002$ respectively); whereas there was no significant difference in T cells responses between moderately affected brains and controls brains ($p=0.39$ and $p=0.41$). The localization of CD3+ and CD8+ cells was more diffuse in severely affected brains than in moderate cases or controls. Although CD3+ cells and CD8+ cells were preferentially localized in the periventricular zones and germinative zones, they were also found in the white matter in severe cases. The principal component analysis evidenced a strong link between viral multiplication, immune responses and cerebral severity.

To further investigate this apparent paradox of concomitant high viral multiplication and high magnitude of T cell responses as a risk factor of severe brain affection, we measured the expression of the inhibitory receptor PD-1 as well as its ligand PD-L1. The membrane associated molecule programmed death-1 (PD-1) expressed on activated lymphocytes has a crucial role in regulating the immune responses by inhibiting T cell receptor signaling and cytokine production (29) and the complex PD1/PD-L1 has become a marker of T cell unresponsiveness or exhaustion (30–32). The development of CD8 T cell exhaustion has been associated with chronic infections such as HIV infection, HCV infection or tuberculosis with high PD-1 expression (33–35). In congenital CMV infection the comparison of immune T cells responses in blood between fetuses sampled in the second trimester and their mothers showed similar levels of cytotoxic cells in both groups but a lower percentage of CTL secreting $\text{INF}\gamma$ in fetuses than in the mothers (36). A more recent study showed that the oligoclonal CD4+ and CD8+ T cells expansions were similar in infected newborns and in adults with primary infection; however paucifunctional responses to CMV antigens were

display by newborns circulating T cells compared to adults ones (37). This reduced functionality was associated with a higher expression of the programmed death-1 (PD-1) inhibitory receptor and the blockage of PD-1 increased T cell IFN γ and interleukine 2 suggesting a potential functional exhaustion of T cells effectors in fetal life (38). In our study, we found PD-1 expressing cells in all CMV infected brains but not in uninfected brain controls. PD-1 expressing cells were preferentially localized in peri-ventricular and germinative zones but were also found in white matter or cortex in the more severely affected brains and there co-localized with CD8+ cells. PD-L1 was also expressed in all infected cases but not in control and the localization mimicked the one of PD-1. PD-1 was expressed at a significantly higher level in severely affected brains than in moderately affected brains ($p=0.001$) or in control brains ($p=0.004$) while PD1 levels were low and not significantly different in moderately affected brains and in controls. In one severely affected brain sample studied by flow cytometry, 91% of CD8+ cells were co-expressing PD-1 suggesting that nearly all CD8+ cells present in severely infected brains are exhausted. Moreover, the proportion of CD8+ cells and of CD3+ cells expressing PD-1 was significantly higher in severely affected brains than in moderately affected ones suggesting a causality link between cytotoxic cells exhaustion and severity of brain lesions.

B cell responses

CD20+ lymphocytes were recruited in infected brains and there was a trend towards higher densities of CD20+ immunolabelling in severely affected brains than in moderately infected ones or in controls but this difference was not significant as already described (9). Plasma cells were detected in infected brains and were localized in periventricular zones and within the whole parenchyma. Teissier *et al* also reported the presence of plasma cells in human fetal infected brains (10) but mainly in perivascular areas while in the MCMV mouse model plasma cells were also found in the ventricles and brain parenchyma (39). Interestingly, the

density of plasma cells was significantly higher in severe cerebral cases than in moderate cerebral cases. The role of humoral immune responses driven by B-lymphocyte lineage cells in brain have been reported for different viral infections and in the MCMV mouse model, infection triggers accumulation and persistence of plasma cells within the brain, which produce antibodies and play a significant role in controlling reactivated virus (39). Whether or not plasma cells in human fetal infected brains produce CMV antibodies is not known, however in our study 75% of CD19+ cells and 90% CD19+CD20+ cells were found to expressed PD-1 in a severely affected brain suggesting a state of immune exhaustion of these cells. Exhaustion of B cells lineage in infection is not well documented in the literature. However, in HIV infection, HIV viremia led to B-cell exhaustion, as manifested by increased expression of multiple inhibitory receptors including PD-1, decreased cell division, decreased proliferative and effector properties in vitro. Furthermore, in the rhesus macaque model, blockade of PD-1 led to increased titers of antibody to SIV antigens (40,41).

Viral multiplication and replication in fetal infected brains

In our study, CMV+ cells were localized in all brain areas (cortical zone and white matter) but were preferentially found in periventricular and germinative zones as described by others (9,10). The density of CMV+ cells in brain was significantly higher in severely affected brains than in moderately affected ones ($p=0.03$). The density of CMV+ cells in placenta was also significantly higher in cases with a severely affected brain than in cases with a moderately affected brain ($p= 0.01$). These results are consistent with the link reported between high fetal blood viral loads, which probably reflect high levels of CMV replication in fetal tissues, and the severity of fetal infections (13,42). CMV can efficiently replicate in the placenta and CMV DNA and gene expression have been found in clinical samples taken from placentas early and late in gestation (43). Therefore, the placenta could act as a viral reservoir (44). Since high antigen levels have been reported as the cause of T cell exhaustion during

chronic viral infection (45) it probably explains why cases with high level of replication in the placenta and in the brain were those with the highest expression of PD-1 in brain cells.

In vitro studies have shown some degree of discrepancies concerning CMV neural cells tropism and impact on neuronal cells differentiation. These discrepancies are readily explained by the use of different concentrations of virus, different viral strains, cells of different origins (cell lines or human neural precursor cells (NPCs) and/or different culture conditions. It is therefore interesting to study the relationship between CMV and neuronal cells directly in infected fetal brains. Here, to better understand the patterns of CMV replication in the fetal brain cells, cell types were separated by flow cytometry from infected brains and CMV DNA was amplified by quantitative PCR in each cell population. CMV DNA was detected in all neuronal cell types and this corroborates the results of an immunohistochemistry study realized in human fetal brain at the same gestational age (10). However, in our study, details on the frequency and the level of DNA replication in different cell types were obtained. CMV DNA replication was detected most frequently and with the highest level in the astrocytes cells' population with replication ranging from 3,000 to 13,000 copies/million cells. In contrast, CMV DNA was detected in the neurons' population in only 2 cases with a lower viral load of 200 and 800 copies/million cells respectively. *In vitro* studies on neural progenitor cells consistently reported that astrocytes derivatives were fully permissive to CMV whereas CMV permissiveness on neuronal derivatives was inconsistently found (46–48), this reflects in our results that clearly show that astrocytes seemed to be a privileged site for CMV replication in human fetal brains. Whether undifferentiated NPCs are fully permissive to HCMV is a matter of debate. In one study NCPs isolated from neonatal tissues were reported as fully permissive to HCMV infection (47) while in another study NCPs isolated from 5 to 12 weeks old fetuses were permissive but few viral particles were released (48). A recent study demonstrated that the effects of CMV depend on NPCs' differentiation state, the most undifferentiated neuronal cells being the less susceptible to

CMV (49). The results from our study seem to corroborate those of this latter study, since CMV DNA was detected in the stem cells' population in only one case among the 5 studied. The quantity of stem cells recovered from brain biopsies tended to be smaller (median 514 cells) than the quantity of astrocytes (median 1519 cells) and this could have influenced the results of CMV PCR. However, these results are in favor of rare and low level of CMV replication in stem cells.

Our study has several limitations. Firstly, the number of cases studied prospectively by flow cytometry was low for obvious reasons. Secondly, although brain biopsies were done in depth in both temporal and frontal area, they did not include peri-ventricular zones because that would have damaged brain samples too much for further pathological analysis. Therefore, the proportion of stem cells was lower (median 3.5%) than it would have been in the peri-ventricular zone and this could have hampered the sensitivity of CMV PCR in this fraction of cells. However, the proportion of astrocytes was also low (6%) compared to the neurons population (88%) and PCR was efficient to detect CMV replication in astrocyte fractions.

Conclusion

These findings together support the hypothesis that in cases with high viral exposure (high viral multiplication in brain and in placenta), effective T-cell mediated control is nearly totally impaired and expansion of total NK cells and its subset NKG2C + cells is promoted. However, NK cell response is itself not sufficient to mitigate brain viral multiplication and this could partly be explained by NK cell exhaustion as suggested by upregulation of PD-1 receptor on NK 56+ NK cells. Brain damage is therefore directly related to the loss of control of virus replication and to CMV direct effect on neuronal cells with high replication in astrocytes that could disrupt their normal supportive function in the brain that is critical for neural circuitry guidance and synaptic integration. These results plead for prompt antiviral treatment to jugulate or at least mitigate viral multiplication as early as possible in cases of

fetal infection. This should help to avoid the vicious circle of high viral loads followed by immune cells exhaustion responsible for more CMV replication and finally brain damage.

MATERIALS AND METHODS

Patients (Table 2)

Fetal brains samples

Cases:

All fetal brain samples were obtained from CMV infected fetuses presenting with cerebral abnormalities detected at ultrasound examination. TOPs were done in the second trimester between 23 and 28 weeks. All autopsies and histological examinations were done in the pathology laboratory of Necker Hospital. Brain samples were classified in severe or moderate cases based on both macroscopic and microscopic data. This was done blindly and independently by the 2 pathologists participating to the study (Dr Bettina Bessi re and Dr Ferechte Razavi). Brain samples were classified in the severely affected group when overt cerebral abnormalities such as microcephaly (<5th percentile), ventriculomegaly, necrosis of the white matter, gyration abnormalities and polymicrogyria were seen. Brain samples were classified in the moderately affected group when only minor abnormalities such as cerebral vascularitis, intra ventricular haemorrhage, germinolysis, ependymitis were present. Macroscopic and microscopic cerebral anomalies detected at post mortem examination of infected cases are detailed in **table 3**.

Controls:

Controls consisted of brain samples obtained from age-matched fetuses terminated for severe anomalies but without cerebral abnormalities, CMV infection or other infections.

The retrospective cohort consisted of 26 brain samples (21 cases and 5 controls) embedded in paraffin and collected between 2000 and 2013.

The prospective cohort consisted of 10 fresh brain biopsies (6 cases and 4 controls) obtained during autopsies realized after termination of pregnancy between 2013 and 2016. Brain biopsies were recovered less than 48 hours after fetal death by feticide and less than 24 hours after delivery. The biopsies were made in the temporal and frontal areas in depth but without reaching the periventricular zones with a bone marrow aspiration trocar (Thiebaud Biomedical Devices, Thonon-les-Bains, France). Several samplings were taken in the same areas.

Placenta:

Placenta samples of the retrospective cohort were studied (21 cases and 5 controls).

Amniotic fluid samples:

For the most recent cases amniotic fluid samples were still available for analysis. All samples were kept at -80°C. Quantitative CMV PCR was realized at the time of the diagnosis of fetal infection with the CMV R-geneTM kit (Argene® BioMérieux, Marcy l'Etoile, France).

Table 2. Characteristics of cases and controls

	Gestational age in weeks	CMV DNA in amniotic fluid in log ₁₀ cp/ml (date of amniocentesis in weeks)	Cerebral severity
Retrospective			
Cases			
1	23	Not available	A
2	28	Not available	B
3	25	Not available	A
4	24	Not available	A
5	23	Not available	A
6	27	Not available	B
7	23	Not available	A
8	28	Not available	A
9	24	6.9 (22)	A
10	25	6.6 (23)	A
11	23	6.8 (20)	B
12	23	7.7 (23)	A
13	28	Not available	A
14	25	6.7 (23)	A
15	28	5.7 (20)	B
16	27	7.5 (25)	A
17	27	Not available	B
18	23	Not available	A
19	24	Not available	B
20	24	Not available	B
21	28	Not available	B
Controls			
22	25	Not done	0
23	23	Not done	0
24	27	Not done	0
25	23	Not done	0
26	28	Not done	0
Prospective			
Cases			
27	23	5.3 (19)	A
28	28	6.8 (25)	A
29*	23	6.3 (21)	A
30*	23	5.8 (21)	B
31	23	6.7 (25)	B
32	23	6.7 (17)	B
Controls			
33	23	Not done	0
34	27	Not done	0
35	27	Not done	0
36	27	Not done	0

*Twins

Table 3. Macroscopic and microscopic cerebral abnormalities at post-mortem examination

	Cases	Maternal age	Weeks	Microcephaly	Necrosis	Calcifications	Ventriculomegaly	Polymicrogyria	Minor brain	Cerebral
			at TOP	< 5th Percentil					abnormalities	severity
Retrospective	1	38	23	1	0	0	1	1	1	A
	2	35	28	0	0	0	0	0	1	B
	3	34	25	1	1	1	1	0	1	A
	4	28	24	1	1	1	0	0	1	A
	5	31	23	1	1	0	0	1	1	A
	6	27	27	0	0	0	0	0	1	B
	7	33	23	0	1	0	0	1	1	A
	8	26	28	1	0	1	0	0	1	A
	9	34	24	Unknown	1	0	1	1	1	A
	10	28	25	0	1	1	1	0	1	A
	11	31	23	0	0	0	0	0	1	B
	12	27	23	0	0	0	1	1	1	A
	13	31	28	Unknown	0	0	1	1	1	A
	14	31	25	1	1	1	1	1	1	A
	15	31	28	0	0	0	0	0	1	B
	16	37	27	1	1	0	1	1	1	A
	17	28	27	0	0	0	0	0	1	B
	18	31	23	0	0	0	1	0	1	A
	19	27	24	0	0	0	0	0	1	B
	20	29	24	0	0	0	0	0	1	B
	21	36	28	0	0	0	0	0	1	B
Prospective	27	35	23	1	1	1	1	1	1	A
	28	36	28	1	1	1	1	1	1	A
	29*	40	23	1	0	1	1	0	1	A
	30*	40	23	0	0	0	0	0	1	B
	31	32	23	0	0	0	0	0	1	B
	32	41	23	0	0	0	0	0	1	B

*Twins; 0= none; 1= presence; TOP, Termination of pregnancy

Ethical statement

All procedures were approved by the ethics committee (Agence de Biomedecine, approval: PFS 15-009) and written parental consent was signed for participation to this research.

Antibodies

All used antibodies and isotypes are detailed in **Table 4**

Table4. Antibodies used for immunohistochemistry and flow cytometry

	Antibodies	Clone	Species	Isotype	Dilution	Source	Target
Immunohistochemistry	CD3	2GV6	rabbit monoclonal	Ig G1	ready to use	Ventana Medical System, Roche diagnostics, Mannheim, Germany	CD3 T lymphocytes
	CD8	c8/144B	mouse monoclonal	Ig G1	1/50	Dako, Glostrup, Denmark	CD8 T lymphocytes
	CD20	L26	mouse monoclonal	Ig G2a	ready to use	Ventana Medical System	CD20 B lymphocytes
	MUM-1 (Multiple Myeloma Oncogene-1)	MUM-1	mouse monoclonal	Ig G1	1/50	Dako	Plasma cells
	NKp46	195314	mouse monoclonal	Ig G2B	1/100	R&D sytems, Bio-techne, Vauban, France	Natural killer (NK), receptor cytotoxic activator
	IE	E13	mouse monoclonal	IgG1k	1/50	Argene, Biomérieux, Marcy l'Etoile, France	Early antigen specific to HCMV
	PD-1 (Programmed Death-1)	NAT105	mouse monoclonal	Ig G1	ready to use	Cell Marque, Emergo Europe, The Hague, Netherlands	PD-1
	PD-L1 (Programmed Death-Ligand 1)	E1L3N	rabbit monoclonal	rabbit IgG	1/100	Cell Signaling technology, Ozyme, Saint Quentin en Yveline, France	PD-L1
FACS ARIA™ III	NKG2C	aa1-30	rabbit	polyclonal	1/100	LifeSpan Biosciences, Clinisciences, Nanterre, France	Human NK receptor activator
	CD45-APC-H7	2D1	mouse monoclonal	Ig G1	1/20	BD Biosciences, le Pont de Claix, France	Leucocytes
	Anti Beta III Tubulin-PerCP	TuJ-1	mouse monoclonal	IgG2A	1/10	R&D sytems	Neurons
	Nestin-PE	rhNestin	mouse monoclonal	IgG1	1/10	R&D sytems	Stem cells
	CD34-BV421	581	mouse monoclonal	IgG1	1/20	BD Biosciences	Hematopoietic cells
	GFAP-AF647	sc-6171	goat	polyclonal	1/20	Santa Cruz biotechnology, Heidelberg, Germany	Astrocytes
	VE-Cadherin-PE	55-7H1	mouse monoclonal	IgG1	1/20	BD Biosciences	Endothelial cells
	VEGFR-2-PE	89106	mouse monoclonal	IgG1	1/20	BD Biosciences	
SMA-FITC	1A4	mouse monoclonal	IgG2A	1/10	Abcam, Cambridge, UK	Pericytes	
NG2-APC	LHM-2	mouse monoclonal	IgG1	1/10	R&D sytems		
LSR FORTESSA™ SORP	CD19 V500	HIB19	mouse monoclonal	IgG1	1/10	BD biosciences	CD19 B-lymphocytes and plasma cells
	PD-1 PE	MIH4	mouse monoclonal	IgG1	1/20	BD biosciences	PD-1
	CD56 BV421	NCAM16.2	mouse monoclonal	IgG2b	1/10	BD biosciences	NK cells
	CD20-APC-H7	L27	mouse monoclonal	IgG1	1/10	BD biosciences	CD20 B lymphocytes
	CD8 PerCP	SK1	mouse monoclonal	IgG1	1/5	BD biosciences	CD8 T lymphocytes
	CD45-PE-Cy7	HI30	mouse monoclonal	IgG1	1/20	BD biosciences	Leucocytes

Immunohistochemistry

Brain samples were fixed in formol zinc special (Microm Microtech, Francheville, France) then embedded in paraffin. Coronal sections of 8 microns (*Charcot section*) were realized and included the cortical zone, the white matter, the ventricular zone and the germinative zone (**S5 Fig**) by the RM2145 microtome Leica® biosystem (Leica, Nanterre, France).

Placenta samples were fixed in 4% formaldehyde ready to use (DiaPath, Martinengo, Italy) then embedded in paraffin. Placental sections of 5 microns were realized from maternal part to fetal part.

CD3/CD8/CD20/MUM-1/NKp46/PD-1 and PD-L1 were realized at European Georges Pompidou hospital, Paris, upon the immunology platform using the automate Benchmark XT ®, Ventana Medical System (Roche diagnostic, Mannheim, Germany). CMV staining was done in the pathology laboratory of Necker hospital with a Leica Bond Max automated IHC/ISH staining instrument (Leica Biosystems). NKG2C staining was realized manually. DAB-chromogen (Dako, Glostrup, Denmark) was used for all staining.

All immune-labeled slides were scanned by the scanner nanozoomer 2.0 HT Digital slide scanner (Hamamastu photonics, Massy, France).

Quantification of immunostaining density

The density of stained cells (CD3/CD8/CD20/MUM-1 and PD-1) in the tissue areas was determined using the computerized image analysis system Developer XD (Definiens Company Munich, Germany). Each tissue area was divided into tiles of 0.8 mm slices and the mean density of immuno-staining for each slide was calculated by the ratio of the number of immuno-labeled cells upon tiles surface. This technology allows non subjective and reproducible analysis.

CMV and NK cells staining could not be quantified with the computerized image analysis system, because although CMV immunostaining was intense, few CMV infected cells were detected and NK cells staining were also detected in a too small number of cells and was not intense enough. Therefore, for these 2 antibodies, the number of labeled immune cells was counted manually on the nanozoomer scans and upon the whole tissue displayed on the slide. To calculate the density of NK and CMV immunostaining (number of immunostained cells / tissue surface) we used the tissue surface calculated for the same brain sample by the image analysis system (tissue surface) in the other immunostaining. Indeed, for each brain sample the sections were consecutive therefore the tissue surface was similar between consecutive slides. NKG2C + cells density could not be calculated because the immunostaining background signal was too high for quantitative imaging analysis and the number of positive cells was too high for manual quantification. PD-L1 density could not be calculated because positive cells were not well separated and aggregated in clusters making manual cell count impossible and quantitative imaging was not possible because the staining was of low intensity.

Preparation of fetal brain cells from fresh brain biopsies

Part of the brain biopsies was rapidly frozen at -80°C in 1 ml of RPMI 1X (Gibco® GlutaMAX™, life technologies, Saint Aubin, France). The other part was submitted to trypsin–versene 10X (EDTA) Eurobio (Villebon-sur-Yvette, France), for 10 min at 37°C then for 5 min at room temperature. Tissues were then suspended in 1 ml Hank's Balanced Salt Solution (HBSS) without Ca^{2+} and Mg^{2+} (Gibco ® Life technologies) in which were added 1 μl of Dnase I (200 U/ml) (Roche, Meylan, France) and 40 μl of 50 mM MgCl_2 (Invitrogen, Life Technologies SAS, Villebon-sur-Yvette, France). This was filtrated through: firstly a 40 μm filter (BD falcon™ cell strainer, Nylon, Pont de Claix, France) and secondly a 35 μm filter (BD falcon™ 12 x 75 mm Tube with Cell Strainer Cap Cells). After filtration, cells were

suspended in Dulbecco's Phosphate Buffered saline 1X (DPBS) without Ca^{2+} and Mg^{2+} (Gibco® Life technologies, Saint Aubin, France). The number of cells was counted in Kova glassic® slide (Hycor Kova®, Hereford, UK) and cell viability was systematically checked by Trypan blue solution (Sigma-Aldrich, L'Isle d'Abeau Chesnes, France) to estimate the number of dead cells. Only cases with more than 70% of cells viability were further processed. At least one million cells were needed for flow cytometric analysis.

Cells were first incubated with a cytometry viability marker either the Fixable Viability Stain 510 or the LIVE/DEAD Fixable Green Dead Cell Stain (Fisher scientific SAS, Illirch, France) depending on the antibodies used. Then cells were incubated with surface antibodies and fixed with BD CellFIX™ 10X (dilution 1/10) (BD Bioscience. When intracellular antibodies were used, cells were submitted to permeabilization and fixation with Cytoperm/Cytofix (BD, BD biosciences, le Pont de Claix, France).

Flow Cytometry

Each antibody was incubated with antibody capture beads (I Cyt® Compset Capture Bead Kit, Champaign, USA) and this was used for compensation of multicolor flow cytometry experiments. Isotypic controls were realized for each fluorochrome.

FACS Aria™ III (BD Bioscience, San Jose, CA) was used to separate and sort cells' populations according to the gating strategy described in **S6 Fig**. FACS LSRFORTESSA™ II SORP (BD Bioscience) was used to detect different receptor expression on leucocytes.

Flow cytometry analyses were performed in the platform of the Structure Fédérative de Recherche (SFR) Necker.

Real Time Polymerase Chain Reaction (PCR)

DNA extraction was realized from the selected cell fractions with the Kit Qiagen® (QIAamp® DNA micro kit, Villebon-sur-Yvette, France) following manufacturer

recommendations. DNA was eluted in 30µl of elution buffer and quantitative real time PCR was performed on 10µl of extracted DNA according to the manufacturer instructions with the CMV R-gene™ kit (Argene® BioMérieux, Marcy l'Etoile, France). To enhance the sensitivity of CMV DNA detection, we tested by PCR each DNA extract 3 times. The results were calculated as the number of genome copies/1 million cells. The sensitivity of the PCR was 8 copies per PCR well.

Statistical analysis

All quantification results were reported on the Excel® software and Fischer test and correlation tests were done also on Excel version 2010. Kruskal-Wallis test used with Dunn's Multiple Comparison's Test, Wilcoxon Mann Whitney, P-value and Standard Error of the Mean (SEM) were realized on GraphPad Prisme version 6.0. Significance was considered when *P* values of <0.05. And software R has been used to make principal component analysis.

ACKNOWLEDGMENTS

We thank laboratory technicians from the Laboratory of Virology as well as the midwives of Necker hospital.

REFERENCES

1. Boppana SB, Rivera LB, Fowler KB, Mach M, Britt WJ. Intrauterine transmission of cytomegalovirus to infants of women with preconceptional immunity. *N Engl J Med.* 3 mai 2001;344(18):1366-71.
2. Ross SA, Boppana SB. Congenital cytomegalovirus infection: outcome and diagnosis. *Semin Pediatr Infect Dis.* janv 2005;16(1):44-9.
3. Pass RF, Fowler KB, Boppana SB, Britt WJ, Stagno S. Congenital cytomegalovirus infection following first trimester maternal infection: symptoms at birth and outcome. *J Clin Virol Off Publ Pan Am Soc Clin Virol.* févr 2006;35(2):216-20.
4. Fowler KB, Stagno S, Pass RF, Britt WJ, Boll TJ, Alford CA. The outcome of congenital cytomegalovirus infection in relation to maternal antibody status. *N Engl J Med.* 5 mars 1992;326(10):663-7.

5. Boppana SB, Fowler KB, Britt WJ, Stagno S, Pass RF. Symptomatic congenital cytomegalovirus infection in infants born to mothers with preexisting immunity to cytomegalovirus. *Pediatrics*. juill 1999;104(1 Pt 1):55-60.
6. Demmler GJ. Congenital cytomegalovirus infection and disease. *Adv Pediatr Infect Dis*. 1996;11:135-62.
7. Cheeran MC-J, Lokensgard JR, Schleiss MR. Neuropathogenesis of Congenital Cytomegalovirus Infection: Disease Mechanisms and Prospects for Intervention. *Clin Microbiol Rev*. 1 janv 2009;22(1):99-126.
8. Gaytant MA, Steegers EAP, Semmekrot BA, Merkus HMMW, Galama JMD. Congenital cytomegalovirus infection: review of the epidemiology and outcome. *Obstet Gynecol Surv*. avr 2002;57(4):245-56.
9. Gabrielli L, Bonasoni MP, Santini D, Piccirilli G, Chiereghin A, Petrisli E, et al. Congenital cytomegalovirus infection: patterns of fetal brain damage. *Clin Microbiol Infect Off Publ Eur Soc Clin Microbiol Infect Dis*. oct 2012;18(10):E419-427.
10. Teissier N, Fallet-Bianco C, Delezoide A-L, Laquerrière A, Marcorelles P, Khung-Savatovsky S, et al. Cytomegalovirus-induced brain malformations in fetuses. *J Neuropathol Exp Neurol*. févr 2014;73(2):143-58.
11. Kimberlin DW, Lin C-Y, Sánchez PJ, Demmler GJ, Dankner W, Shelton M, et al. Effect of ganciclovir therapy on hearing in symptomatic congenital cytomegalovirus disease involving the central nervous system: a randomized, controlled trial. *J Pediatr*. juill 2003;143(1):16-25.
12. Kimberlin DW, Jester PM, Sánchez PJ, Ahmed A, Arav-Boger R, Michaels MG, et al. Valganciclovir for symptomatic congenital cytomegalovirus disease. *N Engl J Med*. 5 mars 2015;372(10):933-43.
13. Leruez-Ville M, Ghout I, Bussièrès L, Stirnemann J, Magny J-F, Couderc S, et al. In utero treatment of congenital cytomegalovirus infection with valacyclovir in a multicenter, open-label, phase II study. *Am J Obstet Gynecol*. 13 avr 2016;
14. Yin X, Li L, Zhang X, Yang Y, Chai Y, Han X, et al. Development of neural stem cells at different sites of fetus brain of different gestational age. *Int J Clin Exp Pathol*. 2013;6(12):2757-64.
15. Sivori S, Vitale M, Morelli L, Sanseverino L, Augugliaro R, Bottino C, et al. p46, a novel natural killer cell-specific surface molecule that mediates cell activation. *J Exp Med*. 6 oct 1997;186(7):1129-36.
16. Jost S, Altfeld M. Control of human viral infections by natural killer cells. *Annu Rev Immunol*. 2013;31:163-94.
17. Mandelboim O, Porgador A. NKp46. *Int J Biochem Cell Biol*. déc 2001;33(12):1147-50.

18. Schafer JL, Li H, Evans TI, Estes JD, Reeves RK. Accumulation of Cytotoxic CD16+ NK Cells in Simian Immunodeficiency Virus-Infected Lymph Nodes Associated with In Situ Differentiation and Functional Anergy. *J Virol.* juill 2015;89(13):6887-94.
19. Foley B, Cooley S, Verneris MR, Curtsinger J, Luo X, Waller EK, et al. Human CMV-induced Memory-like NKG2C+ NK cells are Transplantable and Expand in vivo in Response to Recipient CMV Antigen. *J Immunol Baltim Md 1950.* 15 nov 2012;189(10):5082-8.
20. Della Chiesa M, Falco M, Podestà M, Locatelli F, Moretta L, Frassoni F, et al. Phenotypic and functional heterogeneity of human NK cells developing after umbilical cord blood transplantation: a role for human cytomegalovirus? *Blood.* 12 janv 2012;119(2):399-410.
21. Gumá M, Angulo A, Vilches C, Gómez-Lozano N, Malats N, López-Botet M. Imprint of human cytomegalovirus infection on the NK cell receptor repertoire. *Blood.* 1 déc 2004;104(12):3664-71.
22. Gumá M, Budt M, Sáez A, Brckalo T, Hengel H, Angulo A, et al. Expansion of CD94/NKG2C+ NK cells in response to human cytomegalovirus-infected fibroblasts. *Blood.* 1 mai 2006;107(9):3624-31.
23. Rölle A, Brodin P. Immune Adaptation to Environmental Influence: The Case of NK Cells and HCMV. *Trends Immunol.* mars 2016;37(3):233-43.
24. Noyola DE, Alarcón A, Noguera-Julian A, Muntasell A, Muñoz-Almagro C, García J, et al. Dynamics of the NK-cell subset redistribution induced by cytomegalovirus infection in preterm infants. *Hum Immunol.* mars 2015;76(2-3):118-23.
25. Noyola DE, Fortuny C, Muntasell A, Noguera-Julian A, Muñoz-Almagro C, Alarcón A, et al. Influence of congenital human cytomegalovirus infection and the NKG2C genotype on NK-cell subset distribution in children. *Eur J Immunol.* déc 2012;42(12):3256-66.
26. Huygens A, Dauby N, Vermijlen D, Marchant A. Immunity to Cytomegalovirus in Early Life. *Front Immunol [Internet].* 30 oct 2014 [cité 21 mars 2016];5. Disponible sur: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4214201/>
27. Moraru M, Cisneros E, Gómez-Lozano N, de Pablo R, Portero F, Cañizares M, et al. Host genetic factors in susceptibility to herpes simplex type 1 virus infection: contribution of polymorphic genes at the interface of innate and adaptive immunity. *J Immunol Baltim Md 1950.* 1 mai 2012;188(9):4412-20.
28. Liu LL, Landskron J, Ask EH, Enqvist M, Sohlberg E, Traherne JA, et al. Critical Role of CD2 Co-stimulation in Adaptive Natural Killer Cell Responses Revealed in NKG2C-Deficient Humans. *Cell Rep.* 3 mai 2016;15(5):1088-99.
29. Sharpe AH, Wherry EJ, Ahmed R, Freeman GJ. The function of programmed cell death 1 and its ligands in regulating autoimmunity and infection. *Nat Immunol.* mars 2007;8(3):239-45.

30. Zdrenghea MT, Johnston SL. Role of PD-L1/PD-1 in the immune response to respiratory viral infections. *Microbes Infect Inst Pasteur.* juin 2012;14(6):495-9.
31. Ji M, Liu Y, Li Q, Li X-D, Zhao W-Q, Zhang H, et al. PD-1/PD-L1 pathway in non-small-cell lung cancer and its relation with EGFR mutation. *J Transl Med [Internet].* 16 janv 2015 [cité 21 mars 2016];13. Disponible sur: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4302082/>
32. Schachtele SJ, Hu S, Sheng WS, Mutnal MB, Lokensgard JR. Glial cells suppress postencephalitic CD8+ T lymphocytes through PD-L1. *Glia.* oct 2014;62(10):1582-94.
33. Hassan SS, Akram M, King EC, Dockrell HM, Cliff JM. PD-1, PD-L1 and PD-L2 Gene Expression on T-Cells and Natural Killer Cells Declines in Conjunction with a Reduction in PD-1 Protein during the Intensive Phase of Tuberculosis Treatment. *PloS One.* 2015;10(9):e0137646.
34. Zhang W-J, Peng C-H, Zheng S-S. Programmed death 1 and programmed death ligand 1 expressions in patients with chronic hepatitis B. *Hepatobiliary Pancreat Dis Int HBPD INT.* août 2013;12(4):394-9.
35. Hatano H, Jain V, Hunt PW, Lee T-H, Sinclair E, Do TD, et al. Cell-based measures of viral persistence are associated with immune activation and programmed cell death protein 1 (PD-1)-expressing CD4+ T cells. *J Infect Dis.* juill 2013;208(1):50-6.
36. Pedron B, Guerin V, Jacquemard F, Munier A, Daffos F, Thulliez P, et al. Comparison of CD8+ T Cell responses to cytomegalovirus between human fetuses and their transmitter mothers. *J Infect Dis.* 1 oct 2007;196(7):1033-43.
37. Huygens A, Lecomte S, Tackoen M, Orlislagers V, Delmarcelle Y, Burny W, et al. Functional Exhaustion Limits CD4+ and CD8+ T-Cell Responses to Congenital Cytomegalovirus Infection. *J Infect Dis.* 1 août 2015;212(3):484-94.
38. Huygens A, Lecomte S, Tackoen M, Orlislagers V, Delmarcelle Y, Burny W, et al. Functional Exhaustion Limits CD4+ and CD8+ T-Cell Responses to Congenital Cytomegalovirus Infection. *J Infect Dis.* 1 août 2015;212(3):484-94.
39. Mutnal MB, Hu S, Lokensgard JR. Persistent Humoral Immune Responses in the CNS Limit Recovery of Reactivated Murine Cytomegalovirus. *PLoS ONE.* 6 mars 2012;7(3):e33143.
40. Titanji K, Velu V, Chennareddi L, Vijay-Kumar M, Gewirtz AT, Freeman GJ, et al. Acute depletion of activated memory B cells involves the PD-1 pathway in rapidly progressing SIV-infected macaques. *J Clin Invest.* nov 2010;120(11):3878-90.
41. Velu V, Shetty RD, Larsson M, Shankar EM. Role of PD-1 co-inhibitory pathway in HIV infection and potential therapeutic options. *Retrovirology.* 2015;12:14.
42. Fabbri E, Revello MG, Furione M, Zavattoni M, Lilleri D, Tassis B, et al. Prognostic markers of symptomatic congenital human cytomegalovirus infection in fetal blood. *BJOG Int J Obstet Gynaecol.* mars 2011;118(4):448-56.

43. Trincado DE, Munro SC, Camaris C, Rawlinson WD. Highly sensitive detection and localization of maternally acquired human cytomegalovirus in placental tissue by in situ polymerase chain reaction. *J Infect Dis.* 15 août 2005;192(4):650-7.
44. Davey A, Eastman L, Hansraj P, Hemmings DG. Human cytomegalovirus is protected from inactivation by reversible binding to villous trophoblasts. *Biol Reprod.* juill 2011;85(1):198-207.
45. Mueller SN, Ahmed R. High antigen levels are the cause of T cell exhaustion during chronic viral infection. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 26 mai 2009;106(21):8623-8.
46. Cheeran MC-J, Hu S, Ni HT, Sheng W, Palmquist JM, Peterson PK, et al. Neural precursor cell susceptibility to human cytomegalovirus diverges along glial or neuronal differentiation pathways. *J Neurosci Res.* 15 déc 2005;82(6):839-50.
47. Luo MH, Schwartz PH, Fortunato EA. Neonatal Neural Progenitor Cells and Their Neuronal and Glial Cell Derivatives Are Fully Permissive for Human Cytomegalovirus Infection. *J Virol.* 15 oct 2008;82(20):9994-10007.
48. Odeberg J, Wolmer N, Falci S, Westgren M, Seiger A, Söderberg-Nauclér C. Human cytomegalovirus inhibits neuronal differentiation and induces apoptosis in human neural precursor cells. *J Virol.* sept 2006;80(18):8929-39.
49. González-Sánchez HM, Monsiváis-Urenda A, Salazar-Aldrete CA, Hernández-Salinas A, Noyola DE, Jiménez-Capdeville ME, et al. Effects of cytomegalovirus infection in human neural precursor cells depend on their differentiation state. *J Neurovirol.* août 2015;21(4):346-57.

SUPPORTING INFORMATION

S1 Figure. Example of CD3+ cells density repartition according to the number of tiles.

S2 Figure. Means densities of adaptive immune response cells in fetal brain in 21 cases and 5 controls. Each line represents the mean immunostaining density of CD3, CD8, CD20 and plasma cells (MUM-1) for one brain sample.

S3 Figure. Ratio of means immunostaining densities of PD-1 upon immune responses densities (CD3+, CD8+, CD20+ plasma cell and NK cell) according to brain severity: severe (group A), moderate (group B) and controls.

S4 Figure. Means immunostaining densities in placentas according to brain severity: severe (group A), moderate (group B) and controls. (A) Means densities of CMV+ cells immunostaining. (B₁₋₄) Means densities of immune cells (CD3+, CD8+, CD20+, plasma cells).

S5 Figure. (1) Coronal cerebral section (2) Charcot section cortex, white matter, ventricular area, germinative zone, temporal area.

S6 Figure. Gating strategy to separate the different populations of the fetal brain cells.

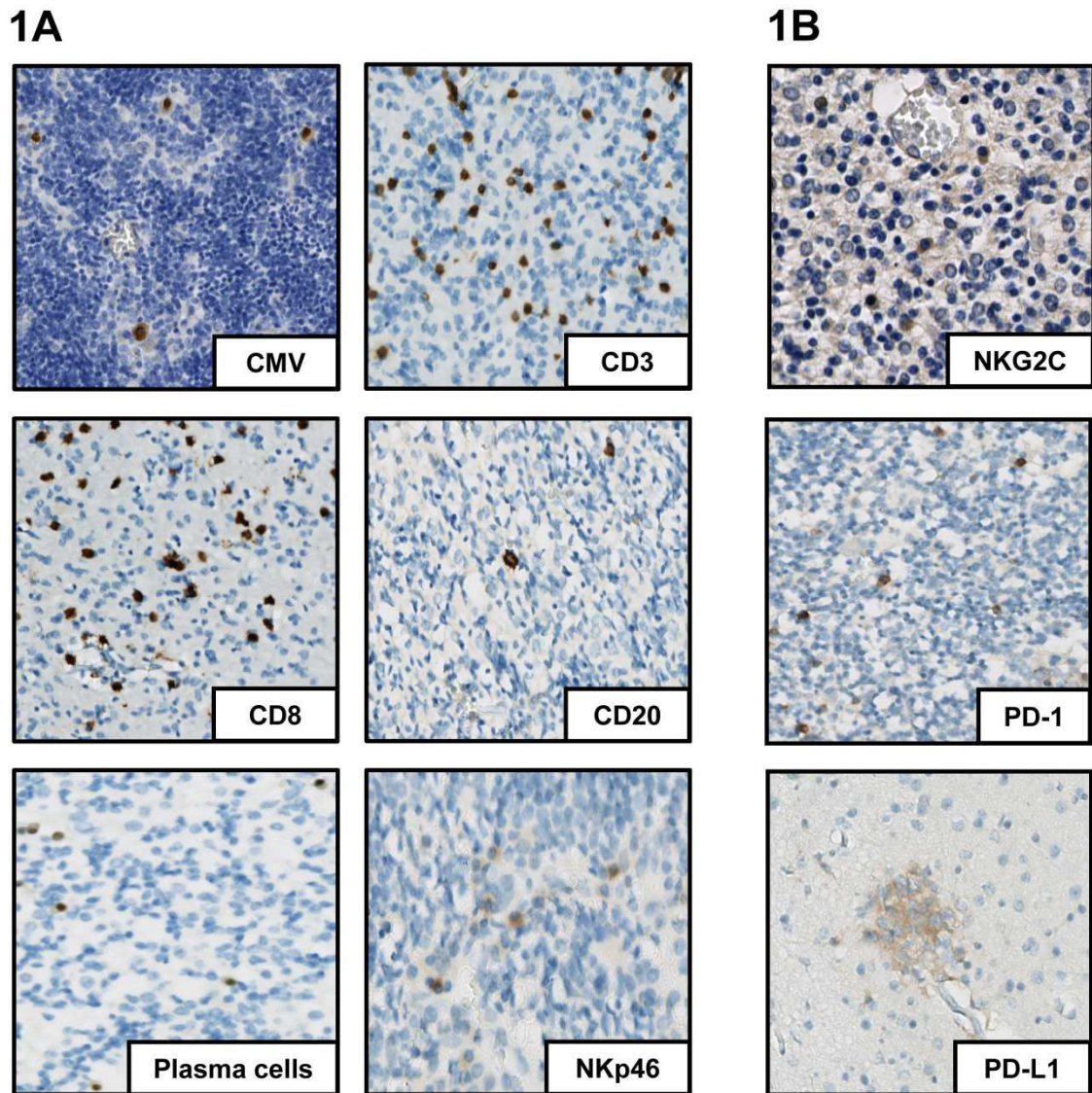


Fig 1. Immunohistochemistry results, in one severely affected brain sample (case Number 7), DAB-chromogen was used and slides were scanned with Nanozoomer 2.0 HT Digital slide scanner, Hamamastu. **(A)** Immunostaining of CMV+ cells and CD3+,CD8+, CD20+, plasma cells and NK cells (NKp46+) . **(B)** Immunostaining of NKG2C+, PD-1 and PD-L1

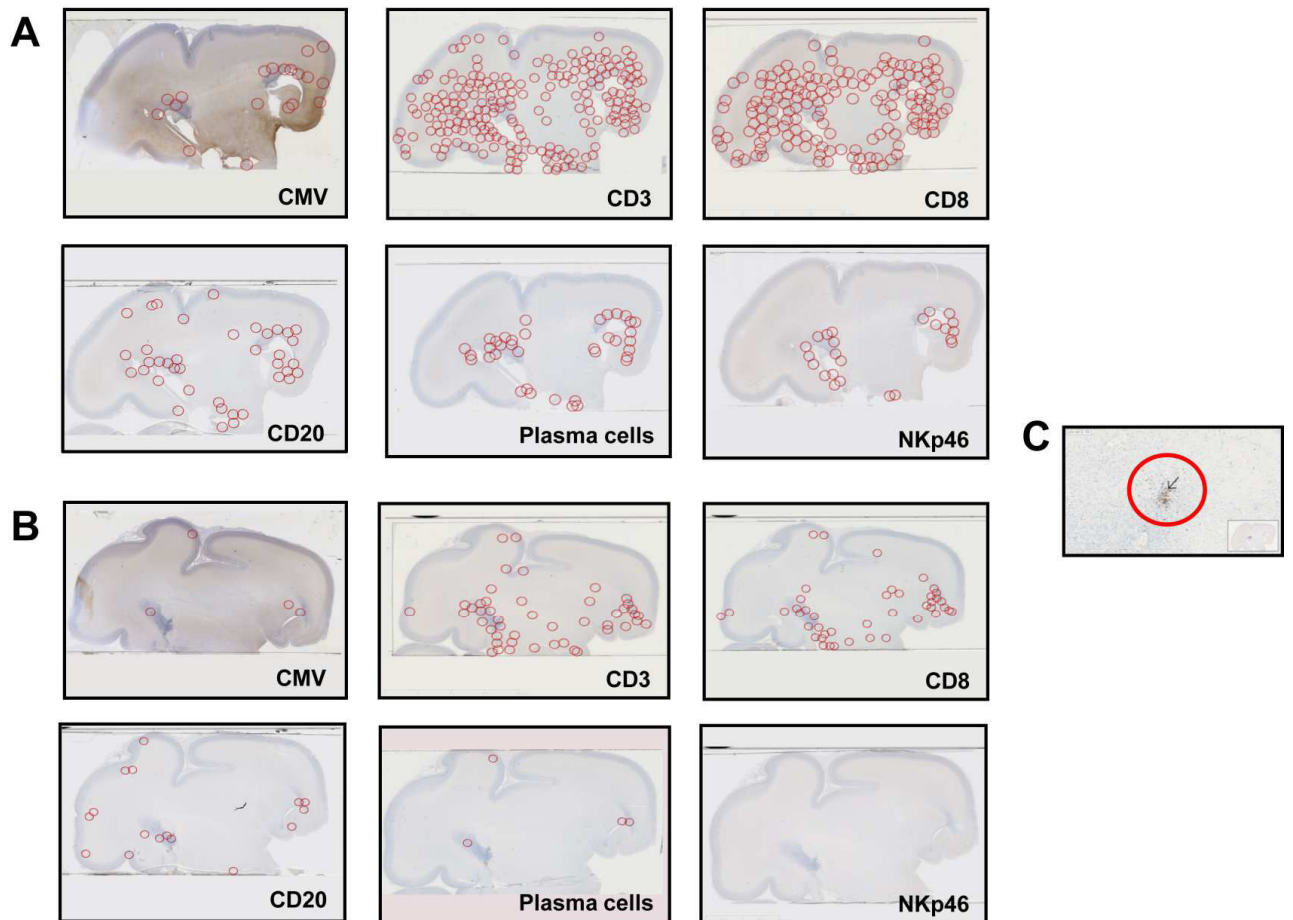


Fig 2. Examples of repartition of CMV+ cells and immune cells
(A) In one brain sample severely affected (group A), successive cuts, case n°8. **(B)** In one brain sample moderately affected (group B), successive cuts, case n°17. **(C)** Red circles show localization of immunostained cells.

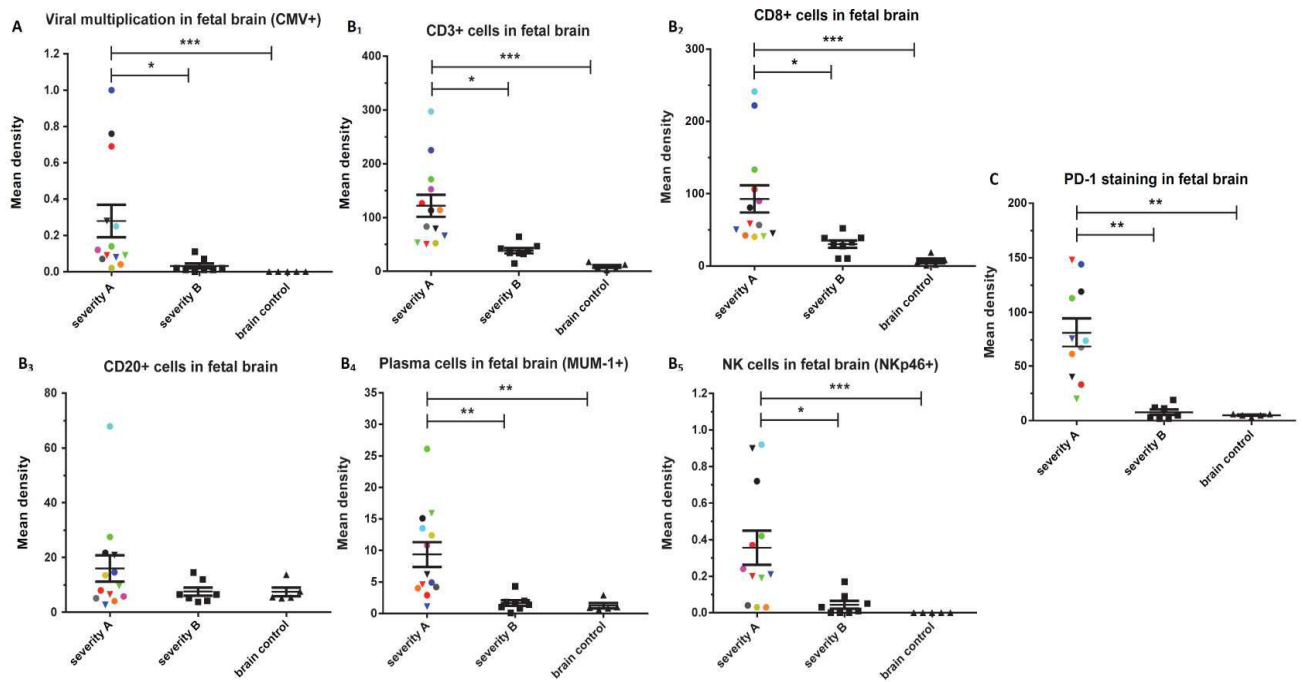


Fig 3. Means immunostaining densities according to brain severity: severe (group A), moderate (group B) and controls. **(A)** Mean densities of CMV+ cells immunostaining, **(B₁₋₅)** Means densities of immune cells (CD3+, CD8+, CD20+, plasma cells, Nkp46+), **(C)** Mean densities of PD-1 immunostaining.

Each case from group A (severely affected) is represented by a specific color dot.

* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$. Kruskal-Wallis test was used with Dunn's Multiple Comparison's Test.

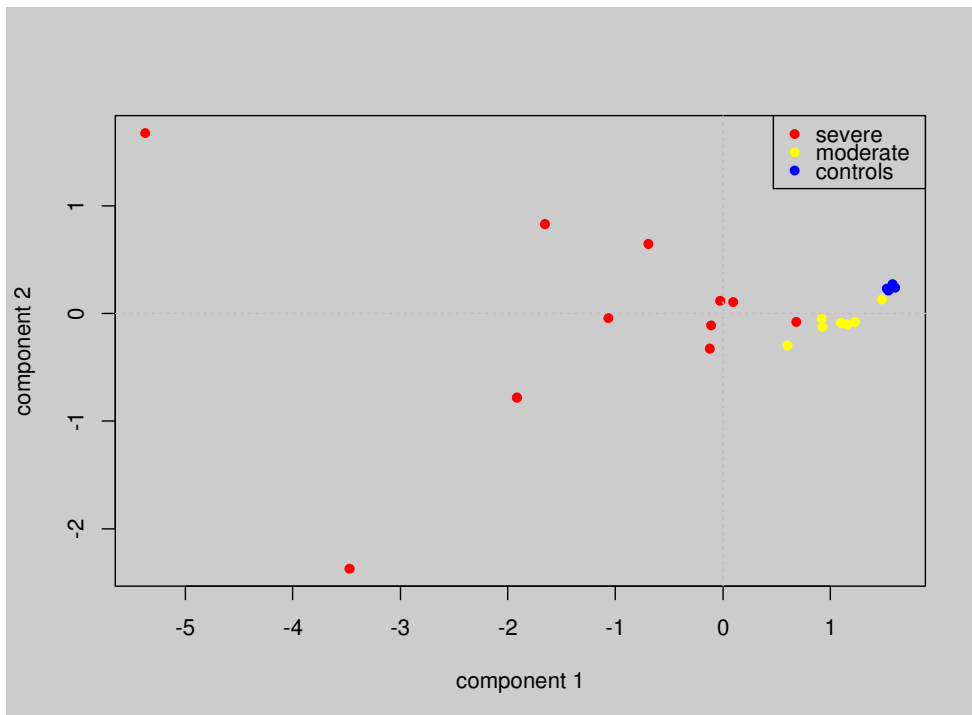


Fig 4. Principal component analysis (PCA) of the adaptive immune response (CD3, CD8, plasma cells), viral multiplication (CMV) and PD-1 in brain according to cerebral severity A (severe)/B (moderate). Severe cases are represented by red dots, moderate cases by yellow dots and controls by blue dots.

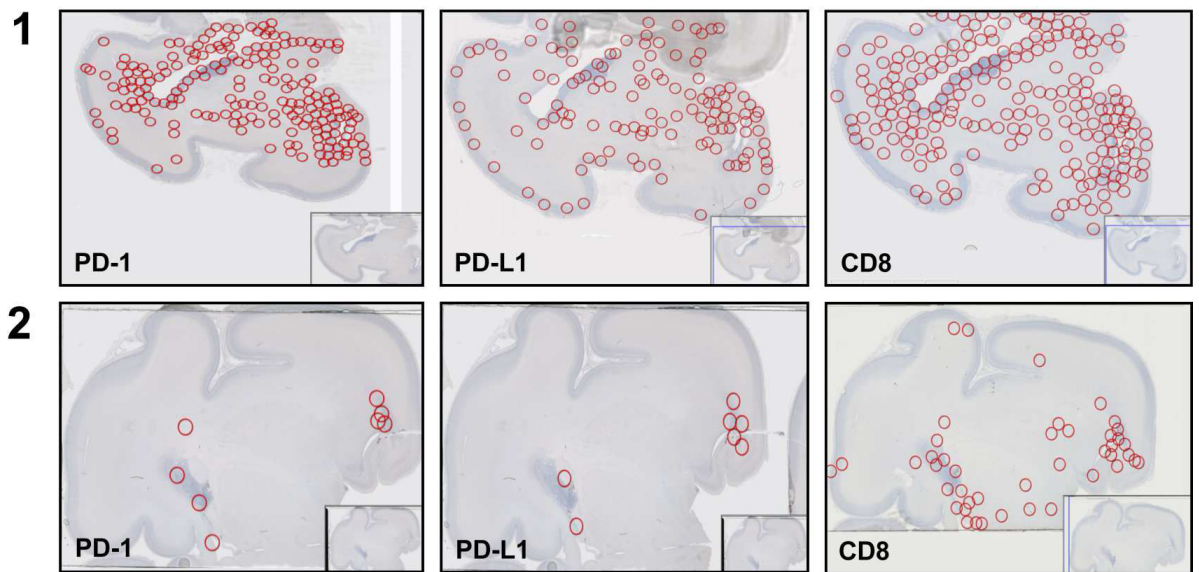


Fig 5. Example of localization of PD-1, PD-L1 and CD8+ immunostaining. **(1)** In one brain sample severely affected (group A), case n°7. **(2)** In one brain sample moderately affected (group B), case n°17.

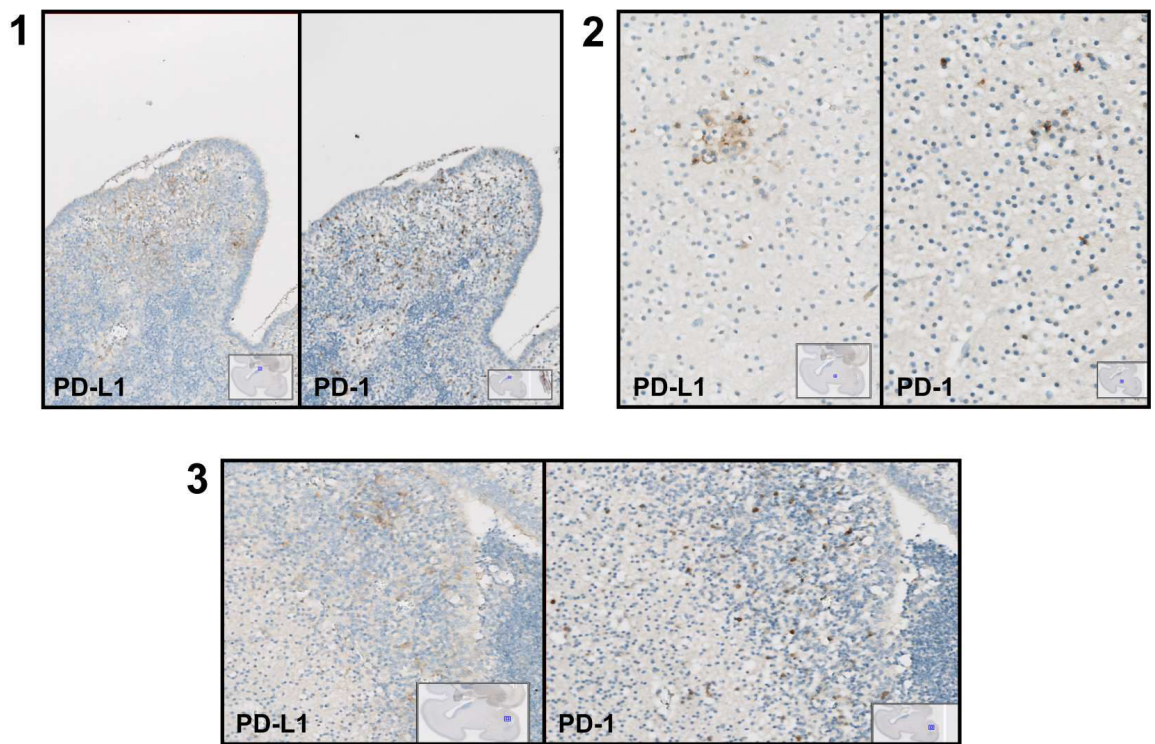


Fig 6. Examples of the localization of PD-1 and PD-L1 immunostaining in fetal brain. PD-1 and PD-L1 immunostaining were co localized in: **(1)** The frontal horn of lateral ventricle **(2)** The white matter **(3)** The temporal horn of lateral ventricle

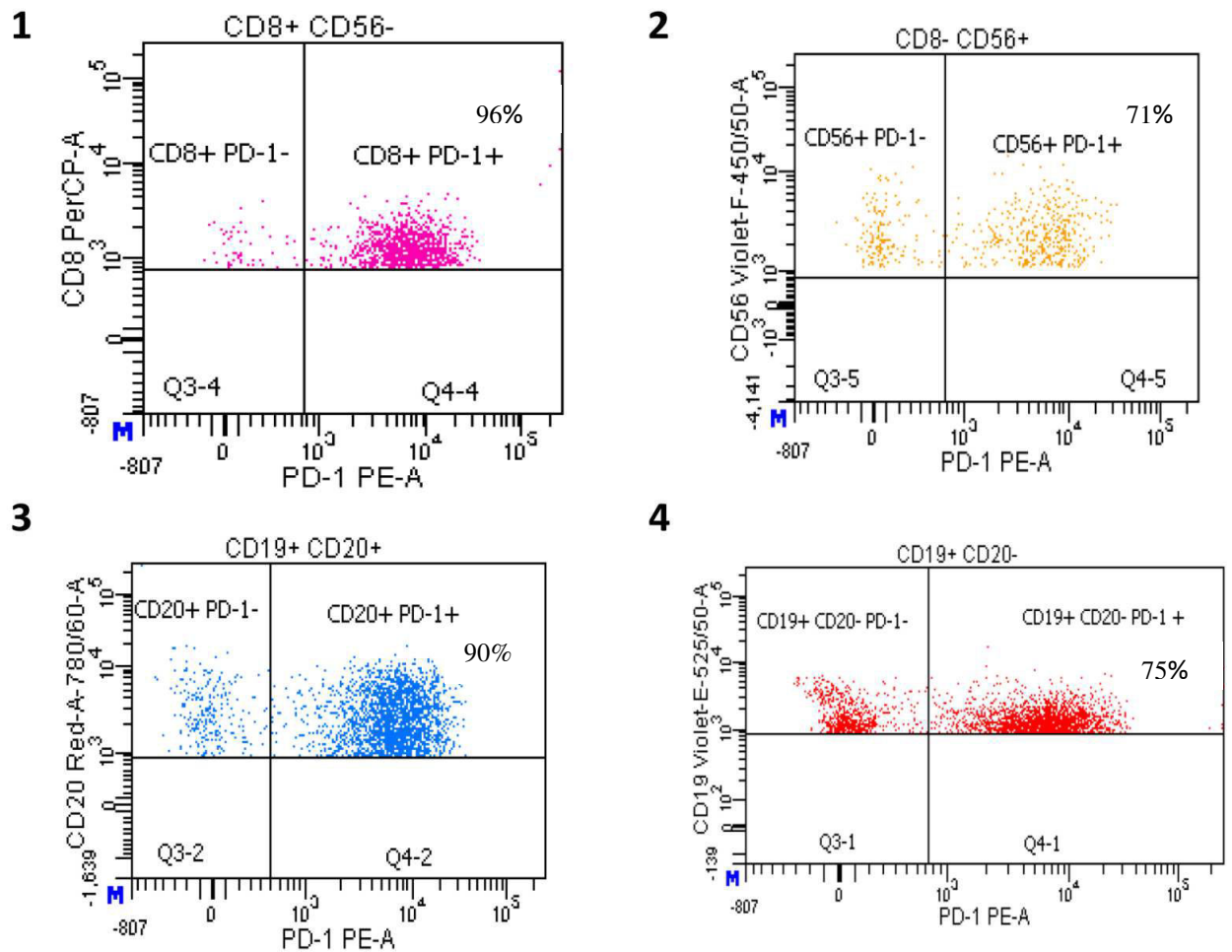
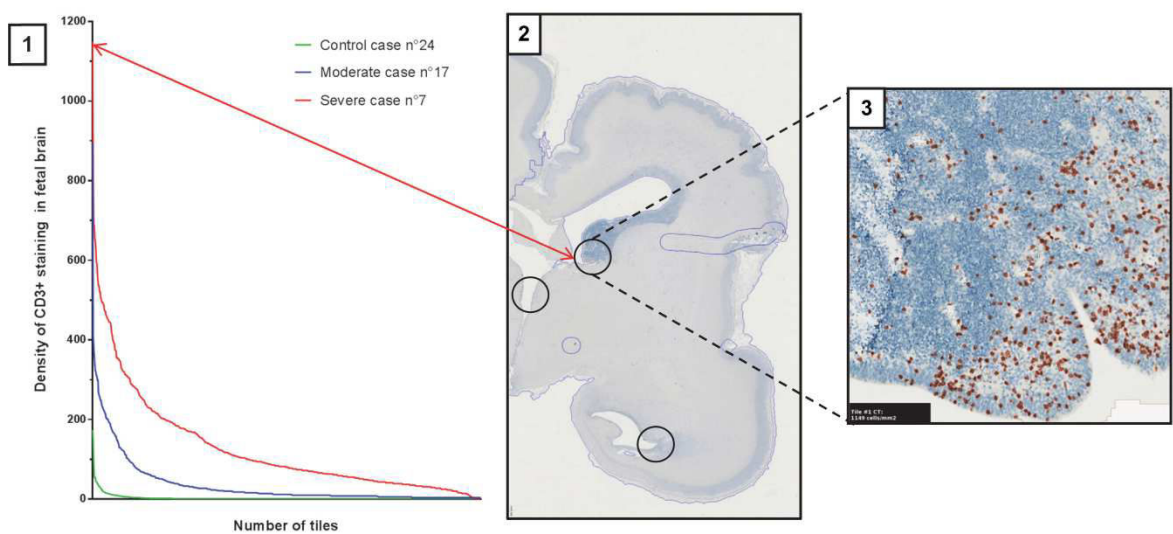
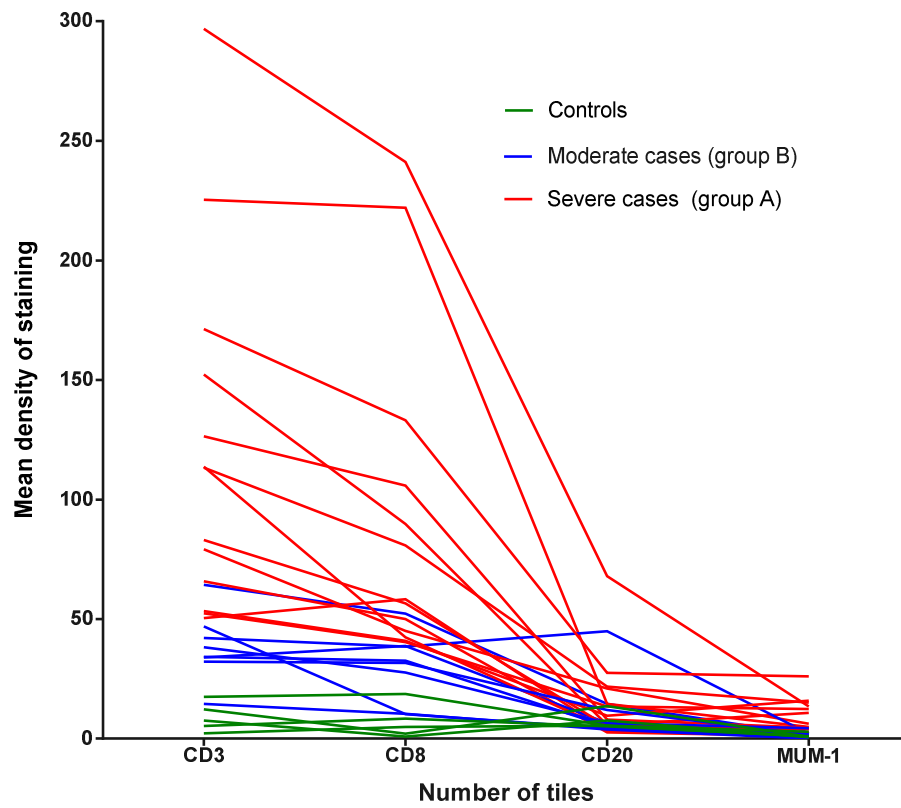


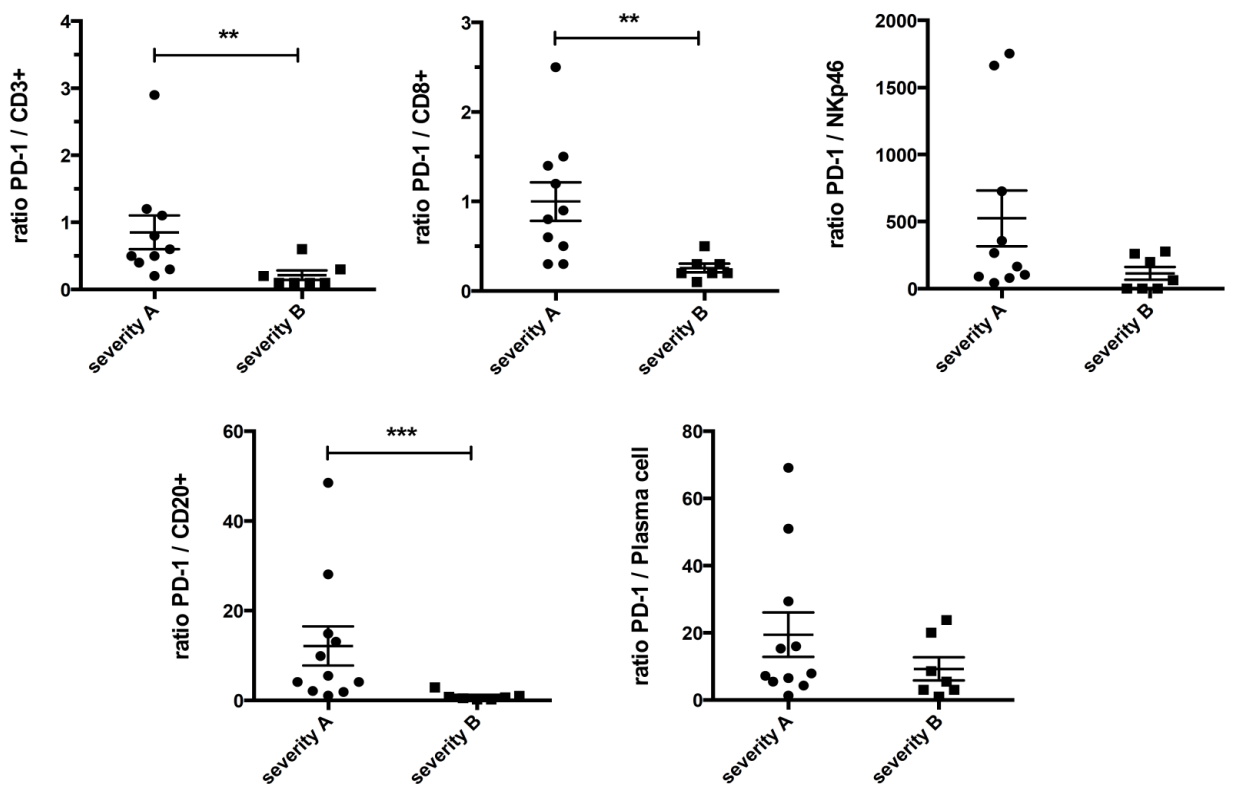
Fig 7. Double immunostaining PD-1/immune cells (CD45+), by FACS LSR FORTRESSA SORP, in human fetal brain infected by HCMV, case n°32. PD-1 was detected in: **(1)** 95 % of CD8+ cells, **(2)** 71% CD56+ cells, **(3)** 90% of CD20+ (CD19+) cells, **(4)** 75% of CD19+ (CD20-) cells.



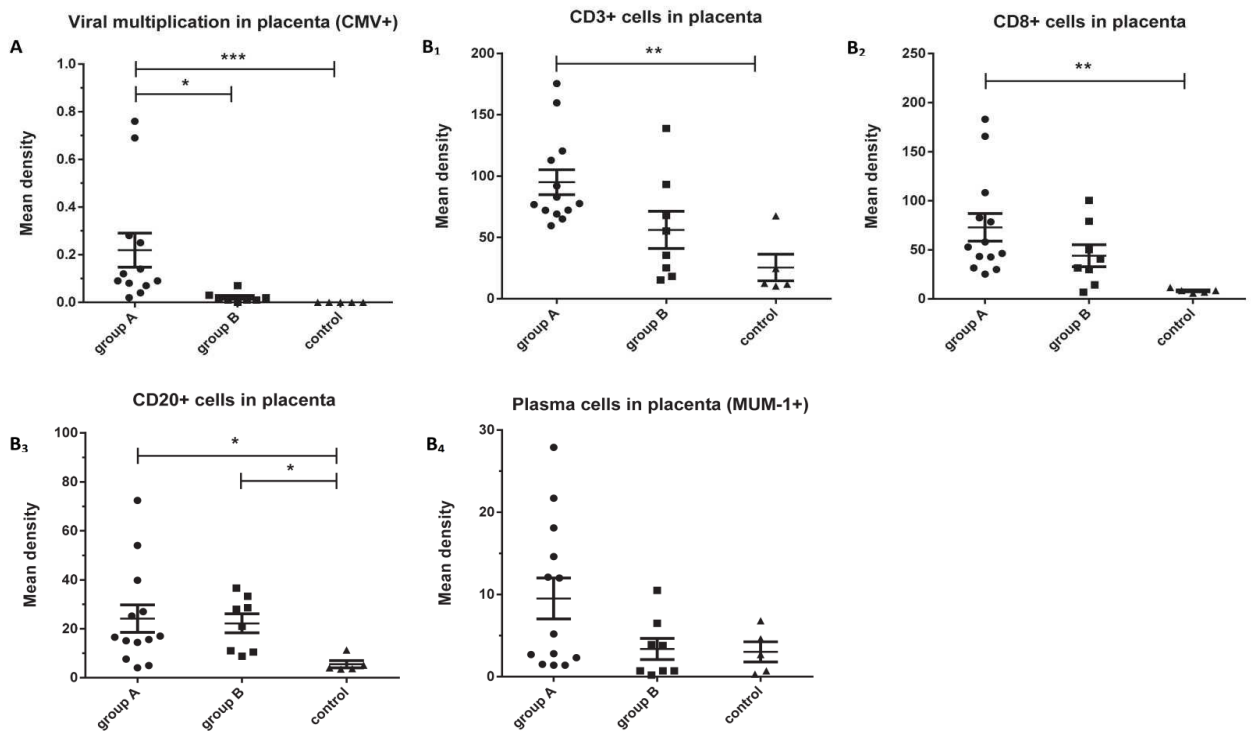
S1 Fig. Example of CD3+ cells density repartition according to the number of tiles. **(1)** Heterogeneity of CD3+ cells density distribution in the whole brain tissue sample (severe, moderate and control cases). **(2)** Highest immunostaining densities were localized in the periventricular areas (black rings). **(3)** In this example, the tile that has the highest density of CD3+ cells was localized in germinative zone of frontal horn of the lateral ventricle.



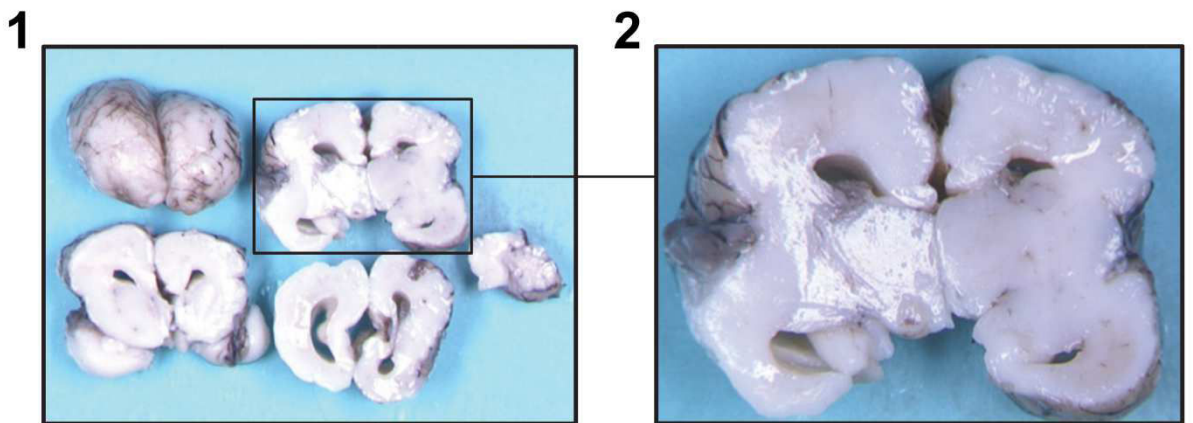
S2 Fig. Means densities of adaptive immune response cells in fetal brain in 21 cases and 5 controls. Each line represents the mean immunostaining density of CD3, CD8, CD20 and plasma cells (MUM-1) for one brain sample. Cases from group A are represented in red, group B in blue and controls in green.



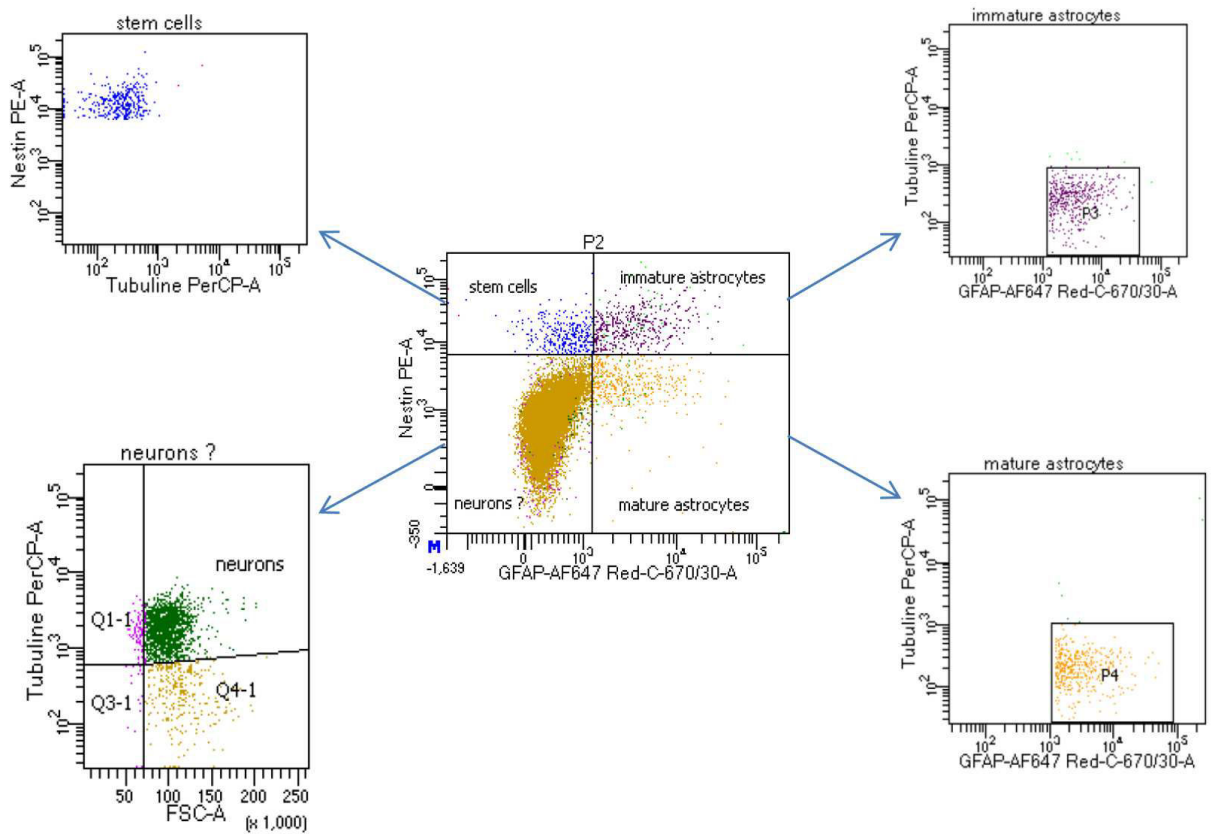
S3 Fig. Ratio of means immunostaining densities of PD-1 upon immune responses densities (CD3+, CD8+, CD20+ plasma cell and NK cell) according to brain severity: severe (group A), moderate (group B) and controls. *p<0.05, **p<0.01, ***p<0.001. Mann-Whitney test.



S4 Fig. Means immunostaining densities in placentas according to brain severity: severe (group A), moderate (group B) and controls. **(A)** Means densities of CMV+ cells immunostaining. **(B₁₋₄)** Means densities of immune cells (CD3+, CD8+, CD20+, plasma cells). * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$. Kruskal-Wallis test was used with Dunn's Multiple Comparison's Test.



S5 Fig: (1) Coronal cerebral section (2) Charcot section cortex, white matter, ventricular area, germinal zone, temporal area (case number 12).



S6 Fig. Gating strategy to separate the different populations of the fetal brain cells. Nestin+, GFAP+, β III tubulin - are immature astrocytes populations (P3); GFAP+, nestin -, β III tubulin- are mature astrocytes populations (P4); β III tubulin+, nestin-, GFAP- are neurons and nestin +, GFAP-, β III tubulin - are stem cells

Evaluation du risque de transmission verticale du CMV en cas de primo-infection maternelle et du pronostic en cas d'infection fœtale à partir des données cliniques et para-cliniques (échographie, bilan virologique ou biologique) maternelles ou fœtales

- **Prédiction de la transmission materno-fœtale, à partir du bilan virologique maternel**

Lors de la découverte d'une primo-infection à CMV au premier trimestre de la grossesse, il est crucial de pouvoir évaluer le risque de transmission de la mère au fœtus afin d'optimiser la prise en charge anténatale. En effet, une évaluation fiable de ce risque de transmission permettrait d'affiner la décision de réaliser ou non une amniocentèse pour le diagnostic d'infection fœtale mais aussi permettrait d'évaluer la pertinence d'un traitement préventif de la transmission lorsqu'un tel traitement sera disponible. La primo infection est définie par l'apparition d'IgG chez un sujet connu séronégatif ou par la coexistence d'IgG et d'IgM associées à un test d'avidité des IgG bas sachant que les tests d'avidité sont parfois difficiles à interpréter (56,66,93,95,254,343). Nous avons souhaité modéliser le risque de transmission materno-fœtale chez des femmes enceintes présentant une sérologie compatible avec une primo-infection récente à partir de marqueurs virologiques simples : IgG, IgM, test d'avidité des IgG et présence d'ADN viral dans le sérum maternel par PCR.

Dans notre première étude, 4,1% de 5000 patientes ayant eu un dépistage de la sérologie CMV à 12 semaines d'aménorrhée avaient des IgM positives, cette incidence était proche de celles décrites dans les précédentes études françaises (344,345). Le taux de transmission fœtale dans le sous-groupe des femmes ayant une suspicion d'infection primaire durant le premier trimestre de grossesse (IgM positives et avidité des IgG faible ou intermédiaire) était de 20 % et de 36,56% (pour les avidités des IgG faibles) soit similaire aux taux décrits dans la littérature (78,82). Nous avons montré dans ce travail que le risque de transmission verticale était d'autant plus important que le taux d'avidité était faible. Par ailleurs, ce risque était aussi significativement augmenté en cas de présence d'ADN CMV dans le sérum maternel. Ce lien entre transmission fœtale et valeur de l'index d'avidité associé à la présence ou non d'ADN CMV dans le sérum maternel peut être utilisé pour modéliser un algorithme de prédiction de la transmission. Ce calcul de risque est maintenant

utilisé dans le laboratoire de l'hôpital Necker-Enfants malades (ANNEXE I). Il permet de fournir un risque individuel de transmission adapté à chaque patiente ce qui permet d'affiner le conseil et les aider pour une décision éclairée du geste invasif qu'est l'amniocentèse.

- **Comparaison des trousse commerciales de test d'avidité pour une meilleure interprétation des résultats**

La fiabilité des résultats des tests d'avidité est un élément central dans l'algorithme de prise en charge de la primo-infection à CMV pendant la grossesse. Cependant, une discordance entre les trousse commerciales d'avidité des IgG est décrite dans la littérature (99,346,347).

Nous avons comparé les résultats d'avidité obtenus avec les 2 trousse commerciales les plus utilisées en France (VIDAS®/LIAISON®) à partir de sérums de femmes enceintes présentant des IgM positives. Nous avons montré dans une première étude (2009-2012) que bien que la corrélation entre les résultats des indices d'avidité obtenus avec les deux trousse de première génération était correcte ($R^2=0,667$), celle obtenue entre les interprétations des tests d'avidité (bas/ intermédiaire/ haut) était mauvaise avec seulement 49% de concordance. Entre 2013 et 2015, nous avons comparé les résultats obtenus avec les trousse d'avidité de 2^{ème} génération des deux mêmes fabricants. La concordance entre les interprétations données par ces 2 tests de 2^{ème} génération était significativement très améliorée par rapport à celle observée entre les tests de première génération (77% versus 49%, $p<0,001$) témoignant d'un progrès notable dans la standardisation des tests. Cependant, cette étude nous a permis de mettre en évidence une faiblesse du test LIAISON ® CMV IgG avidity II qui a rendu des avidités faussement élevées dans deux sérums de primo-infections maternelles très récentes (séroconversion de moins de 15 jours). Depuis, la publication de notre article d'autres cas similaires ont été détectés dans notre laboratoire ou dans d'autres laboratoires. Il s'agit dans tous les cas de sérums avec des taux bas d'IgG mais au-dessus des seuils autorisés pour pratiquer l'avidité.

Ces travaux soulignent que la technique d'avidité des IgG CMV reste une technique critique et difficile dont il est important que le biologiste connaisse parfaitement les limites. Par ailleurs, la réactovigilance dans ce domaine est cruciale et des efforts continus doivent être déployés en ce sens par les laboratoires spécialisés.

- **Pronostic d'une infection fœtale par le HCMV au moment du diagnostic au 2^{ème} trimestre de la grossesse**

Les dernières recommandations nationales concernant la prise en charge de l'infection congénitale à CMV, en date de 2004, précisent qu'à la vue de l'état des connaissances, il ne faut pas pratiquer de dépistage universel ou ciblé de l'infection à CMV pendant la grossesse. Parmi les arguments retenus contre ce dépistage, l'absence de consensus dans la prise en charge était parmi les plus importants. Cette absence de consensus était largement due à l'incertitude concernant le pronostic d'un fœtus infecté. Depuis des progrès notables ont été faits en imagerie fœtale qui est un élément majeur du bilan pronostic. Ainsi, on sait maintenant que la valeur prédictive négative d'une échographie normale du diagnostic à la fin de la grossesse se situe entre 85 et 95% selon les séries (118–121). La valeur prédictive négative de l'échographie au moment du diagnostic au 2^{ème} trimestre qui restait peu documentée a été retrouvée à 93% dans notre étude. La valeur prédictive de l'échographie est élevée lorsque des anomalies cérébrales sévères sont détectées. En revanche cette valeur prédictive positive n'est que de 50 à 60% environ si les signes échographiques sont des signes extra-cérébraux ou cérébraux modérés (85). La valeur prédictive de l'échographie pourrait être améliorée par la combinaison de son résultat à ceux de certains paramètres biologiques et virologiques fœtaux (118,122). Nous avons donc souhaité évaluer la valeur pronostique de l'échographie fœtale associée aux résultats biologiques suivants : à la charge virale dans le liquide amniotique et dans le sang fœtal mais également au taux de plaquettes fœtales.

Nous avons ainsi montré qu'une numération plaquettaire fœtale $\leq 114\,000$ plaquettes/mm³ et/ou une charge virale dans le sang fœtal $\geq 4,93 \log_{10}$ UI/ml augmentaient significativement le risque pour le nouveau-né d'être symptomatique à la naissance. Dans notre étude la charge virale dans le liquide amniotique a été ajustée à l'intervalle de temps entre la date de l'amniocentèse et la date de la primo-infection maternelle. En effet il existe une corrélation positive significative entre l'âge gestationnel à l'amniocentèse et la charge virale dans le liquide amniotique, mais aussi entre l'intervalle de temps entre l'infection primaire maternelle et l'amniocentèse (127–129,334,343,348). Ceci nous a permis de montrer un lien entre une charge virale ajustée élevée dans le liquide amniotique et le pronostic fœtal.

Dans notre étude nous avons montré que la valeur prédictive négative au 2^{ème} trimestre de l'échographie seule était de 93%. On augmente la valeur prédictive négative en associant l'échographie à la charge virale ajustée dans le liquide amniotique (95%) ou aux paramètres sanguins fœtaux (100%). Par ailleurs, en cas de signes échographiques non sévères au 2^{ème} trimestre, la combinaison avec les résultats de la charge virale dans le liquide amniotique ou avec ceux des paramètres biologiques améliore la valeur prédictive positive par rapport à l'échographie seule (78%, 79% et 60% respectivement). On pourrait se demander si l'augmentation de la valeur prédictive négative apportée par les paramètres sanguins est suffisamment pertinente (93 à 100%) pour justifier le risque supplémentaire du geste invasif qu'est la cordocentèse. Mais ce choix relève d'une décision individuelle prise par les femmes enceintes en regard de l'information qui leur est transmise.

Il nous semble donc approprié d'utiliser les résultats présentés ici et leur intervalle de confiance pour conseiller au mieux les patientes. Un arbre décisionnel a été mis en place au centre de diagnostic prénatal de Necker-Enfants malades. Cet arbre combine les différents aspects de la prise en charge en tenant compte notamment des différents résultats obtenus dans les 3 études décrites dans ce travail (ANNEXE II).

Il faut cependant bien souligner que les chiffres donnés dans ce travail, notamment les seuils des charges virales, ne sont pas universels et ne peuvent pas être transposés tels quel dans un autre centre. En effet, il a été montré que même si les charges virales étaient exprimées en unités internationales, des variations importantes persistent entre laboratoires. Dans une étude récente, les charges virales obtenues pour un même panel variaient de plus de 0,5 log₁₀ entre laboratoires pour plus de 50% des échantillons (349).

Enfin, bien que l'utilisation des marqueurs que sont les charges virales et les plaquettes nous a fait progresser pour affiner le bilan pronostique, la valeur prédictive positive des signes échographiques non sévères combinées à ces marqueurs ne dépassait pas 79% dans notre étude, laissant une marge d'amélioration. D'autres marqueurs devraient donc être testés pour tâcher d'affiner encore la prise en charge. Des taux élevés de certains marqueurs de l'inflammation dans le liquide amniotique ou dans le sang fœtal tels que la β 2 microglobuline, l'adiponectine ou l'hémoglobine delta ont été associés à la sévérité de l'infection fœtale et constituent des pistes de recherche à développer (122,350).

Comparaison de la balance réplication virale /réponse immunitaire entre cerveaux fœtaux sévèrement et modérément atteints

La compréhension de la physiopathologie de l'atteinte du cerveau fœtal est primordiale pour définir de futures thérapeutiques *in utero* de l'infection à HCMV. L'objectif de notre étude était de mesurer la multiplication virale et la réponse immunitaire *in situ* dans des cerveaux fœtaux infectés *in vivo*. Pour cela nous avons utilisé 2 approches originales consistant pour l'une à mesurer dans des échantillons de cerveaux inclus les corrélats immuno-virologiques par analyse quantitative d'image et pour l'autre à étudier les différents types cellulaires du cerveau après séparation par cytométrie de flux à partir de biopsies fraîches de cerveaux fœtaux.

Nous avons mis en évidence pour la première fois la présence de cellules NK activées (NKp46+) ainsi que des cellules NKG2C+ typiquement associées à l'infection à HCMV dans tous les cerveaux infectés. La densité de marquage était significativement plus importante dans les cas les plus sévères. Par ailleurs, nous avons pu confirmer que les densités de marquage des lymphocytes T CD3, T CD8 et plasmocytes étaient aussi significativement plus élevée dans les cerveaux les plus sévèrement atteints que dans les cerveaux modérément atteints ou des témoins ainsi que cela avait été rapporté dans la littérature (266,275). Un lien fort a été retrouvé par analyse de composante principale entre une intense multiplication virale, une forte réponse immunitaire adaptative et la sévérité cérébrale. Pour aller plus loin et afin d'investiguer cet apparent paradoxe nous avons mesuré l'expression du complexe PD-1/PD-L1 connu comme inhibiteur de l'activité des lymphocytes. PD-1 était surexprimé dans les cerveaux les plus sévèrement atteints et associés aux lymphocytes T CD8 mais aussi aux lymphocytes B et aux cellules NK. Nous avons ainsi pu montrer que dans les cas d'atteintes les plus sévères l'immunité adaptative est massivement épuisée et que l'immunité innée NK semble partiellement épuisée, l'ensemble étant incapable de maîtriser la multiplication virale. Il a été montré que l'épuisement des cellules immunitaires était causé par la présence de niveaux élevés d'antigène viraux (351). Dans notre étude, les cerveaux les plus atteints étaient ceux où l'épuisement cellulaire était le plus intense et où la multiplication virale dans le cerveau et dans le placenta était la plus élevée. Alors que dans les cerveaux les moins atteints, la proportion de cellules immunitaires épuisées était significativement moins importante et la

multiplication virale dans le cerveau et dans le placenta était significativement plus basse. Ceci suggère qu'un traitement antiviral permettant de diminuer la charge virale dans l'organisme fœtal et notamment dans le cerveau fœtal aurait un impact majeur pour éviter la formation de lésions cérébrales sévères.

Les études *in vitro* d'infection par le HCMV de cellules neuronales en lignées ou de précurseurs cellulaires neuronaux (NCP) ont rapporté des résultats conflictuels concernant la permissivité des cellules neuronales au HCMV (23,262,352). Si toutes ces études concordent sur le fait que les astrocytes soient totalement permissifs au HCMV, la permissivité des neurones et celle des cellules souches semble moins importante et inconstamment retrouvée. Les résultats de notre étude *in vivo* chez le fœtus retrouve une réplication cellulaire dans les 3 types de cellules neuronales mais plus importante en fréquence et en niveau de charge virale dans les astrocytes. La population astrocytaire paraît-être donc le contingent cellulaire majoritaire de la réplication virale *in vivo*. PPAR γ a un rôle dans la régulation du système immunitaire (312) mais également dans la migration du trophoblaste puisqu'il empêcherait la migration et l'invasion physiologique du placenta lorsque le trophoblaste est infecté par le HCMV *in vitro* (306). C'est pourquoi nous avons cherché sa présence dans les cerveaux fœtaux humains *ex vivo*, d'une part pour son rôle dans la réponse immunitaire mais également pour déterminer son rôle potentiel dans la migration des cellules neurales. PPAR γ était retrouvé uniquement dans les zones périventriculaires des cerveaux infectés et n'était pas retrouvé dans les contrôles. Nous avons également détecté des cellules infectées par le HCMV entourées par des cellules positives au PPAR γ . Cette partie de l'étude *ex vivo* complète la partie *in vitro* qui a montré qu'une activation du PPAR γ sans infection avait un impact sur la neurogenèse et que la présence de CMV activait PPAR γ . L'ensemble de ces données suggère que PPAR γ serait impliqué dans la neurogenèse et tout particulièrement, serait un effecteur dans la physiopathologie de l'infection congénitale à HCMV.

Cette dernière partie donne des éléments de réponse pour mieux comprendre la physiopathologie, encore mal connue, de l'atteinte cérébrale fœtale dans l'infection congénitale à HCMV. Pour progresser sur ce sujet nous souhaitons évaluer le profil cytokinique *in situ* dans les biopsies de cerveaux mais aussi dans le liquide amniotique de fœtus infectés présentant ou non des lésions cérébrales. L'expression du complexe PD-1 / PD-L1 suggère un épuisement de la réponse immunitaire or deux études ont rapporté la présence

de granzyme B (impliqué dans la cytotoxicité) dans les cerveaux infectés par le HCMV (266,275). Il serait intéressant en immunohistochimie mais également par d'autres méthodes (comme par cytométrie en flux) de rechercher dans nos cas la présence du granzyme B. Nous pourrions également compléter cette analyse par la recherche de perforine et le TNF β , puisque nous avons montré que le marquage PD-1 était exprimé sur les CD8 mais aussi sur les NK et lymphocytes B. Notre stratégie de gating pourrait être étendue afin d'intégrer la recherche de ces derniers et l'ensemble de notre étude pourrait être complété par l'analyse du transcriptome.

La réponse immunitaire innée et adaptative (cellulaire et humorale), le facteur de transcription cellulaire (PPAR γ) et la multiplication virale, sont majoritairement localisés dans les zones périventriculaires : zone d'échange entre le cerveau et l'extérieur, zone contrôlée par la barrière hémato-encéphalique qui contient des astrocytes. Or on sait que les astrocytes sont les cellules majoritairement infectées par le HCMV et que la gliogenèse est fortement influencée par une balance des cytokines anti et pro-inflammatoires (279). Il a également été décrit chez la souris en post encéphalite à MCMV que les astrocytes exprimaient le PD-L1 (191), celui-là même impliqué dans l'épuisement de la réponse immunitaire. Il serait intéressant de regarder si ces cellules, mais aussi les autres lignées de cellules cérébrales, expriment le PD-L1 dans un contexte d'infection congénitale à HCMV notamment par les techniques que nous avons mises au point en cytométrie en flux pour séparer les cellules du cerveau.

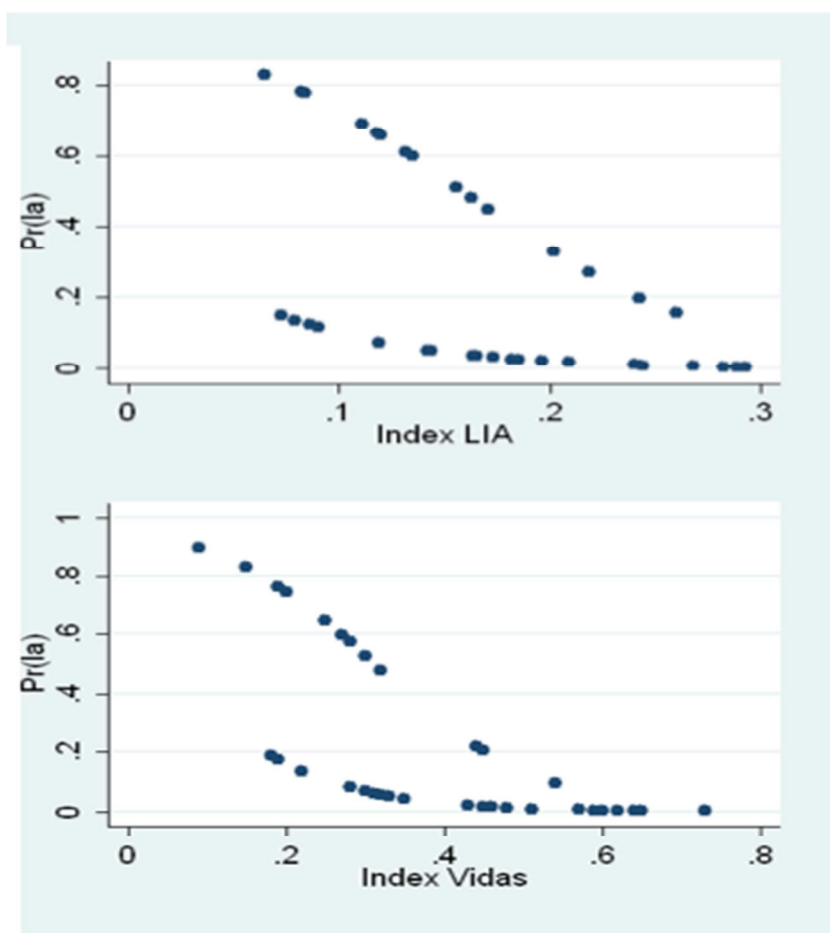
La microglie (macrophages résidents du cerveau et de la moelle épinière) ne semble pas permissive à la production virale chez l'Homme (255). Cependant le rôle de ces cellules impliquées dans la réponse innée contre l'infection à CMV du système nerveux central est encore mal connu. Néanmoins étant en première ligne de défense et proches des cellules susceptibles, elles pourraient avoir un rôle dans la dissémination virale (5,31). Il serait intéressant de poursuivre notre étude en intégrant également ces macrophages cérébraux mais aussi les autres cellules immunitaires que l'on sait impliquées dans la réponse immunitaire contre le CMV dans les tissus périphériques : les cellules dendritiques, les neutrophiles et les lymphocytes T régulateurs.

CONCLUSION

Les résultats de nos travaux participent à l'avancée des connaissances pour une meilleure prise en charge clinique des cas d'infections materno-fœtales à CMV. Notamment la mise au point d'algorithmes pour le diagnostic de la primo-infection maternelle et l'évaluation du bilan pronostic d'une infection fœtale était nécessaire pour aider à l'élaboration de recommandations nationales. En effet, à la vue de ces nouvelles connaissances les recommandations de l'HAS de 2004 nécessitent une réactualisation afin d'améliorer et de standardiser la prise en charge et le conseil prodigué aux couples en France.

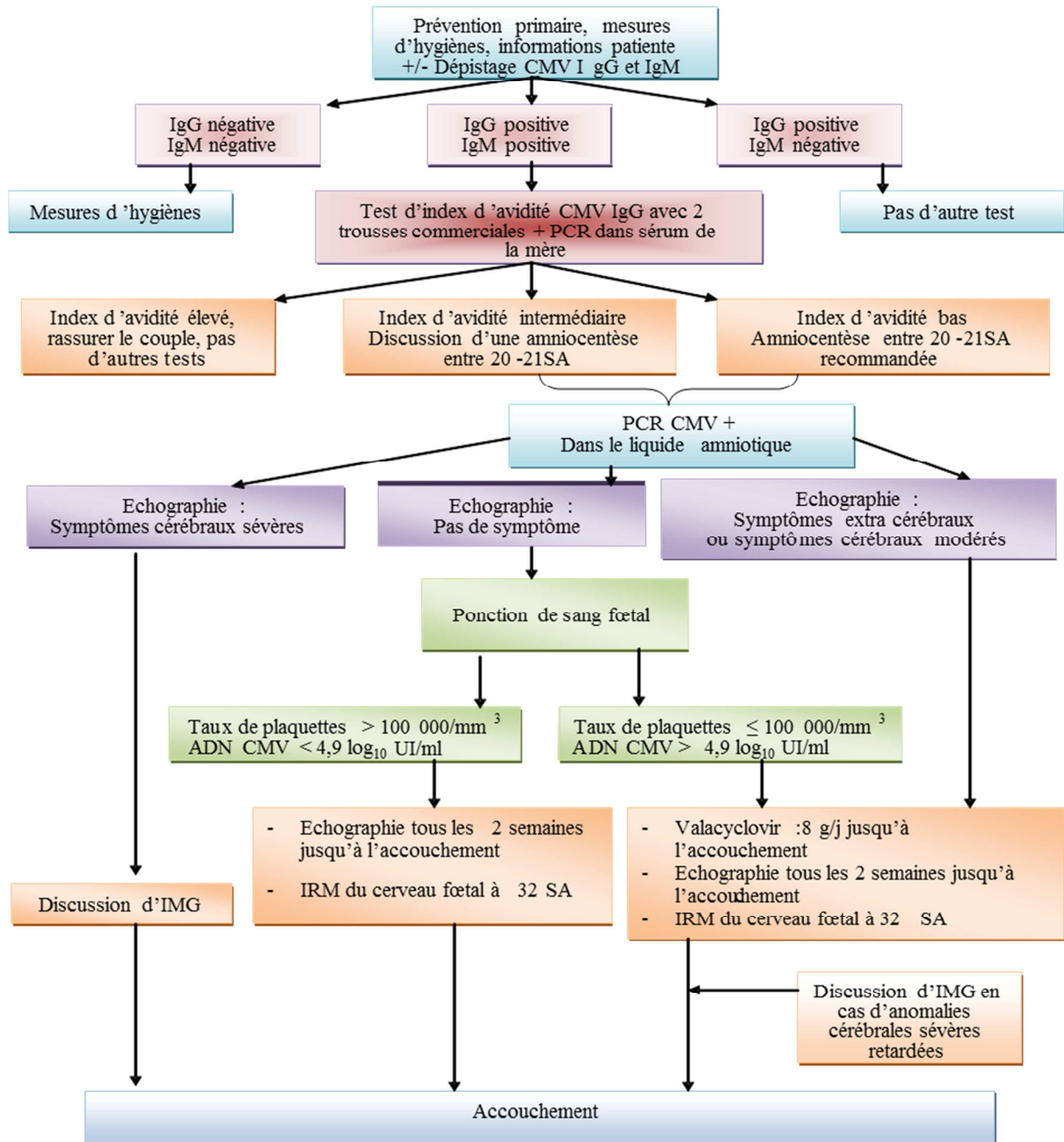
Par ailleurs, nous avons montré dans ce travail que les cas d'infections cérébrales sévères à HCMV étaient en lien avec une réplication virale élevée et une réponse immunitaire quantitativement forte mais partiellement inefficace comme le suggère la surexpression de marqueurs d'épuisement immun. Ceci semble impliquer qu'un traitement antiviral, en faisant baisser la charge virale, permettrait d'éviter le développement de lésions cérébrales sévères. Une première étude clinique a d'ailleurs permis de montrer que le traitement par le valaciclovir de femmes porteuses de fœtus infectés symptomatiques permettait d'améliorer le pronostic de ces fœtus (141). Le valaciclovir permettait d'obtenir une baisse de la charge virale fœtale sans la rendre indétectable. Ainsi d'autres efforts doivent être faits concernant le développement de traitements antiviraux de l'infection fœtale.

ANNEXE I



Modèle de calcul de risque de transmission fœtale en cas d'IgM positives au 1^{er} trimestre de grossesse : Index d'avidité des IgG (Vidas ou LIAson) et résultat qualitatif de la PCR CMV dans le sérum maternel. Le pronostic du risque (Pr) de transmission aide à la prise de décision de prise en charge. Cet algorithme est utilisé au laboratoire de virologie de l'hôpital Necker-Enfants malades.

ANNEXE II



Arbre décisionnel lors d'une transmission fœtale confirmée par la présence de la charge virale dans le liquide amniotique

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

1. Ho M. The history of cytomegalovirus and its diseases. *Med Microbiol Immunol (Berl)*. juin 2008;197(2):65-73.
2. Smith MG. Propagation in Tissue Cultures of a Cytopathogenic Virus from Human Salivary Gland Virus (SGV) Disease. *Exp Biol Med*. 6 janv 1956;92(2):424-30.
3. P. Row W, W. Hartley J, Waterman S, C. Turner H, J. Huebner R. Cytopathogenic Agent Resembling Human Salivary Gland Virus Recovered from Tissue Cultures of Human Adenoids. *Exp Biol Med*. 6 janv 1956;92(2):418-24.
4. Blanc WA. Pathways of fetal and early neonatal infection. *J Pediatr*. oct 1961;59(4):473-96.
5. Crough T, Khanna R. Immunobiology of Human Cytomegalovirus: from Bench to Bedside. *Clin Microbiol Rev*. 1 janv 2009;22(1):76-98.
6. McGavran MH, Smith MG. Ultrastructural, cytochemical, and microchemical observations on cytomegalovirus (salivary gland virus) infection of human cells in tissue culture. *Exp Mol Pathol*. 1965;4(1):1-10.
7. Sijmons S, Thys K, Mbong Ngwese M, Van Damme E, Dvorak J, Van Loock M, et al. High-throughput analysis of human cytomegalovirus genome diversity highlights the widespread occurrence of gene-disrupting mutations and pervasive recombination. *J Virol*. 13 mai 2015;
8. Chee M, Rudolph SA, Plachter B, Barrell B, Jahn G. Identification of the major capsid protein gene of human cytomegalovirus. *J Virol*. 3 janv 1989;63(3):1345-53.
9. Tomtishen III JP. Human cytomegalovirus tegument proteins (pp65, pp71, pp150, pp28). *Virol J*. 17 janv 2012;9:22.
10. Britt WJ, Jarvis M, Seo J-Y, Drummond D, Nelson J. Rapid Genetic Engineering of Human Cytomegalovirus by Using a Lambda Phage Linear Recombination System: Demonstration that pp28 (UL99) Is Essential for Production of Infectious Virus. *J Virol*. janv 2004;78(1):539-43.
11. Silva MC, Yu Q-C, Enquist L, Shenk T. Human Cytomegalovirus UL99-Encoded pp28 Is Required for the Cytoplasmic Envelopment of Tegument-Associated Capsids. *J Virol*. oct 2003;77(19):10594-605.
12. Mocarski E, Shenk T, Pass R. cytomegalovirus. *Fields Virol*. 2007;Vol. 2.(D.M.Knipe and P.M.Howley, editors.Lippincot, Willams and Wilkins):p.2739-2746.
13. Bresnahan WA, Shenk T. A Subset of Viral Transcripts Packaged Within Human Cytomegalovirus Particles. *Science*. 30 juin 2000;288(5475):2373-6.

14. Navarro D, Paz P, Tugizov S, Topp K, La Vail J, Pereira L. Glycoprotein B of human cytomegalovirus promotes virion penetration into cells, transmission of infection from cell to cell, and fusion of infected cells. *Virology*. nov 1993;197(1):143-58.
15. Keay S, Baldwin B. The human fibroblast receptor for gp86 of human cytomegalovirus is a phosphorylated glycoprotein. *J Virol*. août 1992;66(8):4834-8.
16. Compton T, Nowlin DM, Cooper NR. Initiation of human cytomegalovirus infection requires initial interaction with cell surface heparan sulfate. *Virology*. avr 1993;193(2):834-41.
17. Britt WJ, Mach M. Human cytomegalovirus glycoproteins. *Intervirology*. 1996;39(5-6):401-12.
18. COTIN S. cytomégaloVirus humain, mutation de résistances et nouveaux anti-viraux. [p 219]: Faculté de médecine, Ecole doctorale Science Technologie Santé, Université de Limoges; 2011.
19. Kaye JF, Gompels UA, Minson AC. Glycoprotein H of human cytomegalovirus (HCMV) forms a stable complex with the HCMV UL115 gene product. *J Gen Virol*. oct 1992;73 (Pt 10):2693-8.
20. Spaete RR, Perot K, Scott PI, Nelson JA, Stinski MF, Pachl C. Coexpression of truncated human cytomegalovirus gH with the UL115 gene product or the truncated human fibroblast growth factor receptor results in transport of gH to the cell surface. *Virology*. avr 1993;193(2):853-61.
21. Huber MT, Compton T. The human cytomegalovirus UL74 gene encodes the third component of the glycoprotein H-glycoprotein L-containing envelope complex. *J Virol*. oct 1998;72(10):8191-7.
22. Sinzger C, Kahl M, Laib K, Klingel K, Rieger P, Plachter B, et al. Tropism of human cytomegalovirus for endothelial cells is determined by a post-entry step dependent on efficient translocation to the nucleus. *J Gen Virol*. déc 2000;81(Pt 12):3021-35.
23. Luo MH, Schwartz PH, Fortunato EA. Neonatal Neural Progenitor Cells and Their Neuronal and Glial Cell Derivatives Are Fully Permissive for Human Cytomegalovirus Infection. *J Virol*. 15 oct 2008;82(20):9994-10007.
24. Plachter B, Sinzger C, Jahn G. Cell types involved in replication and distribution of human cytomegalovirus. *Adv Virus Res*. 1996;46:195-261.
25. Sinzger C, Jahn G. Human cytomegalovirus cell tropism and pathogenesis. *Intervirology*. 1996;39(5-6):302-19.
26. Sinzger C, Plachter B, Grefte A, The TH, Jahn G. Tissue macrophages are infected by human cytomegalovirus in vivo. *J Infect Dis*. janv 1996;173(1):240-5.

27. Ryckman BJ, Chase MC, Johnson DC. HCMV gH/gL/UL128-131 interferes with virus entry into epithelial cells: evidence for cell type-specific receptors. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 16 sept 2008;105(37):14118-23.
28. Neyts J, Snoeck R, Schols D, Balzarini J, Esko JD, Van Schepdael A, et al. Sulfated polymers inhibit the interaction of human cytomegalovirus with cell surface heparan sulfate. *Virology*. juill 1992;189(1):48-58.
29. Kimpton CP, Morris DJ, Corbitt G. Inhibitory effects of various anticoagulants on the infectivity of human cytomegalovirus. *J Virol Methods*. juin 1989;24(3):301-6.
30. Compton T. Receptors and immune sensors: the complex entry path of human cytomegalovirus. *Trends Cell Biol*. janv 2004;14(1):5-8.
31. Wang X, Huong S-M, Chiu ML, Raab-Traub N, Huang E-S. Epidermal growth factor receptor is a cellular receptor for human cytomegalovirus. *Nature*. 24 juill 2003;424(6947):456-61.
32. Wang X, Huang DY, Huong S-M, Huang E-S. Integrin alphavbeta3 is a coreceptor for human cytomegalovirus. *Nat Med*. mai 2005;11(5):515-21.
33. Soroceanu L, Akhavan A, Cobbs CS. Platelet-derived growth factor-alpha receptor activation is required for human cytomegalovirus infection. *Nature*. 18 sept 2008;455(7211):391-5.
34. Pietropaolo R, Compton T. Interference with annexin II has no effect on entry of human cytomegalovirus into fibroblast cells. *J Gen Virol*. juill 1999;80 (Pt 7):1807-16.
35. Vanarsdall AL, Johnson DC. Human cytomegalovirus entry into cells. *Curr Opin Virol*. févr 2012;2(1):37-42.
36. Döhner K, Sodeik B. The role of the cytoskeleton during viral infection. *Curr Top Microbiol Immunol*. 2005;285:67-108.
37. Emery VC, Griffiths PD. Molecular biology of cytomegalovirus. *Int J Exp Pathol*. déc 1990;71(6):905-18.
38. Fatahzadeh M, Schwartz RA. Human herpes simplex virus infections: epidemiology, pathogenesis, symptomatology, diagnosis, and management. *J Am Acad Dermatol*. nov 2007;57(5):737-763-766.
39. Dal Monte P, Bessia C, Landini MP, Michelson S. Expression of human cytomegalovirus ppUL83 (pp65) in a stable cell line and its association with metaphase chromosomes. *J Gen Virol*. oct 1996;77 (Pt 10):2591-6.
40. Stenberg RM. The human cytomegalovirus major immediate-early gene. *Intervirology*. 1996;39(5-6):343-9.

41. Isomura H, Stinski MF. The Human Cytomegalovirus Major Immediate-Early Enhancer Determines the Efficiency of Immediate-Early Gene Transcription and Viral Replication in Permissive Cells at Low Multiplicity of Infection. *J Virol.* mars 2003;77(6):3602-14.
42. Colberg-Poley AM. Functional roles of immediate early proteins encoded by the human cytomegalovirus UL36-38, UL115-119, TRS1/IRS1 and US3 loci. *Intervirology.* 1996;39(5-6):350-60.
43. Xu Y, Cei SA, Huete AR, Pari GS. Human cytomegalovirus UL84 insertion mutant defective for viral DNA synthesis and growth. *J Virol.* oct 2004;78(19):10360-9.
44. Iwayama S, Yamamoto T, Furuya T, Kobayashi R, Ikuta K, Hirai K. Intracellular localization and DNA-binding activity of a class of viral early phosphoproteins in human fibroblasts infected with human cytomegalovirus (Towne strain). *J Gen Virol.* déc 1994;75 (Pt 12):3309-18.
45. Ertl PF, Powell KL. Physical and functional interaction of human cytomegalovirus DNA polymerase and its accessory protein (ICP36) expressed in insect cells. *J Virol.* juill 1992;66(7):4126-33.
46. Weiland KL, Oien NL, Homa F, Wathen MW. Functional analysis of human cytomegalovirus polymerase accessory protein. *Virus Res.* déc 1994;34(3):191-206.
47. Sinclair J, Sissons P. Latency and reactivation of human cytomegalovirus. *J Gen Virol.* juill 2006;87(Pt 7):1763-79.
48. Gillespie GM, Wills MR, Appay V, O'Callaghan C, Murphy M, Smith N, et al. Functional heterogeneity and high frequencies of cytomegalovirus-specific CD8(+) T lymphocytes in healthy seropositive donors. *J Virol.* sept 2000;74(17):8140-50.
49. Pass RF, Stagno S, Dworsky ME, Smith RJ, Alford CA. Excretion of cytomegalovirus in mothers: observations after delivery of congenitally infected and normal infants. *J Infect Dis.* juill 1982;146(1):1-6.
50. Nelson CT, Demmler GJ. Cytomegalovirus infection in the pregnant mother, fetus, and newborn infant. *Clin Perinatol.* mars 1997;24(1):151-60.
51. Pass RF, Hutto C. Group day care and cytomegaloviral infections of mothers and children. *Rev Infect Dis.* août 1986;8(4):599-605.
52. Coonrod D, Collier AC, Ashley R, DeRouen T, Corey L. Association between cytomegalovirus seroconversion and upper genital tract infection among women attending a sexually transmitted disease clinic: a prospective study. *J Infect Dis.* mai 1998;177(5):1188-93.
53. Murph JR, Bale JF, Murray JC, Stinski MF, Perlman S. Cytomegalovirus transmission in a Midwest day care center: possible relationship to child care practices. *J Pediatr.* juill 1986;109(1):35-9.

54. Guibert G, Warszawski J, Le Chenadec J, Blanche S, Benmebarek Y, Mandelbrot L, et al. Decreased risk of congenital cytomegalovirus infection in children born to HIV-1-infected mothers in the era of highly active antiretroviral therapy. *Clin Infect Dis Off Publ Infect Dis Soc Am.* 1 juin 2009;48(11):1516-25.
55. Mussi-Pinhata MM, Yamamoto AY, Figueiredo LT, Cervi MC, Duarte G. Congenital and perinatal cytomegalovirus infection in infants born to mothers infected with human immunodeficiency virus. *J Pediatr.* févr 1998;132(2):285-90.
56. Vauloup-Fellous C, Grangeot-Keros L, Rozenberg F. Cytomégalovirus et grossesse. *Virologie.* 1 mai 2009;13(3):145-58.
57. Gaytant MA, Steegers EAP, Semmekrot BA, Merkus HMMW, Galama JMD. Congenital cytomegalovirus infection: review of the epidemiology and outcome. *Obstet Gynecol Surv.* avr 2002;57(4):245-56.
58. Cannon MJ. Congenital cytomegalovirus (CMV) epidemiology and awareness. *J Clin Virol Off Publ Pan Am Soc Clin Virol.* déc 2009;46 Suppl 4:S6-10.
59. Cannon MJ, Schmid DS, Hyde TB. Review of cytomegalovirus seroprevalence and demographic characteristics associated with infection. *Rev Med Virol.* juill 2010;20(4):202-13.
60. Lepoutre A, Antona D, Fonteneau L, et al. Séroprévalence des maladies à prévention vaccinale et de cinq autres maladies infectieuses en France. Résultats de deux enquêtes nationales 2008-2010. *BEH.* 2013.
61. Lanzieri TM, Dollard SC, Bialek SR, Grosse SD. Systematic review of the birth prevalence of congenital cytomegalovirus infection in developing countries. *Int J Infect Dis IJID Off Publ Int Soc Infect Dis.* mai 2014;22:44-8.
62. Gratacap-Cavallier B, Morand P, Dutertre N, Bosson JL, Baccard-Longère M, Jouk PS, et al. [Cytomegalovirus infection in pregnant women. Seroepidemiological prospective study in 1,018 women in Isere]. *J Gynécologie Obstétrique Biol Reprod.* mars 1998;27(2):161-6.
63. Jones CA. Congenital cytomegalovirus infection. *Curr Probl Pediatr Adolesc Health Care.* mars 2003;33(3):70-93.
64. Yamamoto AY, Mussi-Pinhata MM, Boppana SB, Novak Z, Wagatsuma VM, Oliveira P de F, et al. Human cytomegalovirus reinfection is associated with intrauterine transmission in a highly cytomegalovirus-immune maternal population. *Am J Obstet Gynecol.* mars 2010;202(3):297.e1-8.
65. Boppana SB, Rivera LB, Fowler KB, Mach M, Britt WJ. Intrauterine transmission of cytomegalovirus to infants of women with preconceptional immunity. *N Engl J Med.* 3 mai 2001;344(18):1366-71.
66. Kenneson A, Cannon MJ. Review and meta-analysis of the epidemiology of congenital cytomegalovirus (CMV) infection. *Rev Med Virol.* juill 2007;17(4):253-76.

67. Wang C, Zhang X, Bialek S, Cannon MJ. Attribution of congenital cytomegalovirus infection to primary versus non-primary maternal infection. *Clin Infect Dis Off Publ Infect Dis Soc Am.* 15 janv 2011;52(2):e11-13.
68. Crozat-teissier N. modélisation et caractérisation de l'atteinte cochléaire et cérébrale lors de l'infection materno-foetale à CMV [Thèse]. Université Paris 5; 2012.
69. Townsend CL, Forsgren M, Ahlfors K, Ivarsson S-A, Tookey PA, Peckham CS. Long-term outcomes of congenital cytomegalovirus infection in Sweden and the United Kingdom. *Clin Infect Dis Off Publ Infect Dis Soc Am.* mai 2013;56(9):1232-9.
70. Anderson KS, Amos CS, Boppana S, Pass R. Ocular abnormalities in congenital cytomegalovirus infection. *J Am Optom Assoc.* mai 1996;67(5):273-8.
71. Coats DK, Demmler GJ, Paysse EA, Du LT, Libby C. Ophthalmologic findings in children with congenital cytomegalovirus infection. *J AAPOS Off Publ Am Assoc Pediatr Ophthalmol Strabismus Am Assoc Pediatr Ophthalmol Strabismus.* avr 2000;4(2):110-6.
72. Fowler KB, Pass RF. Risk factors for congenital cytomegalovirus infection in the offspring of young women: exposure to young children and recent onset of sexual activity. *Pediatrics.* août 2006;118(2):e286-292.
73. Dollard SC, Grosse SD, Ross DS. New estimates of the prevalence of neurological and sensory sequelae and mortality associated with congenital cytomegalovirus infection. *Rev Med Virol.* oct 2007;17(5):355-63.
74. Nyholm JL, Schleiss MR. Prevention of maternal cytomegalovirus infection: current status and future prospects. *Int J Womens Health.* 2010;2:23-35.
75. Fowler KB, Stagno S, Pass RF, Britt WJ, Boll TJ, Alford CA. The outcome of congenital cytomegalovirus infection in relation to maternal antibody status. *N Engl J Med.* 5 mars 1992;326(10):663-7.
76. Ross SA, Fowler KB, Ashrith G, Stagno S, Britt WJ, Pass RF, et al. Hearing loss in children with congenital cytomegalovirus infection born to mothers with preexisting immunity. *J Pediatr.* mars 2006;148(3):332-6.
77. Gindes L, Teperberg-Oikawa M, Sherman D, Pardo J, Rahav G. Congenital cytomegalovirus infection following primary maternal infection in the third trimester. *BJOG Int J Obstet Gynaecol.* juin 2008;115(7):830-5.
78. Enders G, Daiminger A, Bäder U, Exler S, Enders M. Intrauterine transmission and clinical outcome of 248 pregnancies with primary cytomegalovirus infection in relation to gestational age. *J Clin Virol Off Publ Pan Am Soc Clin Virol.* nov 2011;52(3):244-6.
79. Feldman B, Yinon Y, Tepperberg Oikawa M, Yoeli R, Schiff E, Lipitz S. Pregestational, periconceptual, and gestational primary maternal cytomegalovirus infection: prenatal diagnosis in 508 pregnancies. *Am J Obstet Gynecol.* oct 2011;205(4):342.e1-6.

80. Picone O, Vauloup-Fellous C, Cordier AG, Guitton S, Senat MV, Fuchs F, et al. A series of 238 cytomegalovirus primary infections during pregnancy: description and outcome. *Prenat Diagn.* août 2013;33(8):751-8.
81. Foulon I, Naessens A, Foulon W, Casteels A, Gordts F. A 10-year prospective study of sensorineural hearing loss in children with congenital cytomegalovirus infection. *J Pediatr.* juill 2008;153(1):84-8.
82. Revello MG, Fabbri E, Furione M, Zavattoni M, Lilleri D, Tassis B, et al. Role of prenatal diagnosis and counseling in the management of 735 pregnancies complicated by primary human cytomegalovirus infection: a 20-year experience. *J Clin Virol Off Publ Pan Am Soc Clin Virol.* avr 2011;50(4):303-7.
83. Guerra B, Simonazzi G, Puccetti C, Lanari M, Farina A, Lazzarotto T, et al. Ultrasound prediction of symptomatic congenital cytomegalovirus infection. *Am J Obstet Gynecol.* avr 2008;198(4):380.e1-7.
84. Gabrielli L, Bonasoni MP, Lazzarotto T, Lega S, Santini D, Foschini MP, et al. Histological findings in fetuses congenitally infected by cytomegalovirus. *J Clin Virol.* déc 2009;46:S16-21.
85. Benoist G, Salomon LJ, Jacquemard F, Daffos F, Ville Y. The prognostic value of ultrasound abnormalities and biological parameters in blood of fetuses infected with cytomegalovirus. *BJOG Int J Obstet Gynaecol.* juin 2008;115(7):823-9.
86. Hui L, Wood G. Perinatal outcome after maternal primary cytomegalovirus infection in the first trimester: a practical update and counseling aid. *Prenat Diagn.* janv 2015;35(1):1-7.
87. Boppana SB, Pass RF, Britt WJ, Stagno S, Alford CA. Symptomatic congenital cytomegalovirus infection: neonatal morbidity and mortality. *Pediatr Infect Dis J.* févr 1992;11(2):93-9.
88. Kylat RI, Kelly EN, Ford-Jones EL. Clinical findings and adverse outcome in neonates with symptomatic congenital cytomegalovirus (SCCMV) infection. *Eur J Pediatr.* nov 2006;165(11):773-8.
89. Morton CC, Nance WE. Newborn hearing screening--a silent revolution. *N Engl J Med.* 18 mai 2006;354(20):2151-64.
90. Gandhi RS, Fernandez-Alvarez JR, Rabe H. Management of congenital cytomegalovirus infection: an evidence-based approach. *Acta Paediatr Oslo Nor* 1992. avr 2010;99(4):509-15.
91. Fowler KB, Dahle AJ, Boppana SB, Pass RF. Newborn hearing screening: will children with hearing loss caused by congenital cytomegalovirus infection be missed? *J Pediatr.* juill 1999;135(1):60-4.

92. Avettand-Fenoel V, Magny J-F, Ville Y, Leruez-Ville M. [Virological tools for the diagnosis, the prognosis and the surveillance of congenital cytomegalovirus infections]. *Arch Pédiatrie Organe Off Société Fr Pédiatrie*. févr 2013;20(2):204-8.
93. Benard M-CM. Conséquences de l'infection à cytomégalovirus sur le placenta humain [Internet] [phd]. Université de Toulouse, Université Toulouse III - Paul Sabatier; 2014 [cité 20 août 2015]. Disponible sur: <http://thesesups.ups-tlse.fr/2355/>
94. ANAES. Évaluation de l'intérêt du dépistage de l'infection à cytomégalovirus chez la femme enceinte en France. ANAES Ed. 2004;
95. Ross DS, Dollard SC, Victor M, Sumartojo E, Cannon MJ. The epidemiology and prevention of congenital cytomegalovirus infection and disease: activities of the Centers for Disease Control and Prevention Workgroup. *J Womens Health* 2002. avr 2006;15(3):224-9.
96. Lazzarotto T, Guerra B, Spezzacatena P, Varani S, Gabrielli L, Pradelli P, et al. Prenatal diagnosis of congenital cytomegalovirus infection. *J Clin Microbiol*. déc 1998;36(12):3540-4.
97. Revello MG, Gerna G. Diagnosis and management of human cytomegalovirus infection in the mother, fetus, and newborn infant. *Clin Microbiol Rev*. oct 2002;15(4):680-715.
98. Bratcher DF, Bourne N, Bravo FJ, Schleiss MR, Slaoui M, Myers MG, et al. Effect of passive antibody on congenital cytomegalovirus infection in guinea pigs. *J Infect Dis*. oct 1995;172(4):944-50.
99. Revello MG, Genini E, Gorini G, Klersy C, Piralla A, Gerna G. Comparative evaluation of eight commercial human cytomegalovirus IgG avidity assays. *J Clin Virol Off Publ Pan Am Soc Clin Virol*. août 2010;48(4):255-9.
100. Revello MG, Sarasini A, Zavattoni M, Baldanti F, Gerna G. Improved prenatal diagnosis of congenital human cytomegalovirus infection by a modified nested polymerase chain reaction. *J Med Virol*. sept 1998;56(1):99-103.
101. Gerna G, Lilleri D, Fornara C, Bruno F, Gabanti E, Cane I, et al. Differential kinetics of human cytomegalovirus load and antibody responses in primary infection of the immunocompetent and immunocompromised host. *J Gen Virol*. févr 2015;96(Pt 2):360-9.
102. Berth M, Grangeot-Keros L, Heskia F, Dugua J-M, Vauloup-Fellous C. Analytical issues possibly affecting the performance of commercial human cytomegalovirus IgG avidity assays. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis Off Publ Eur Soc Clin Microbiol*. sept 2014;33(9):1579-84.
103. Baccard-Longere M, Freymuth F, Cointe D, Seigneurin JM, Grangeot-Keros L. Multicenter evaluation of a rapid and convenient method for determination of cytomegalovirus immunoglobulin G avidity. *Clin Diagn Lab Immunol*. mars 2001;8(2):429-31.

104. Bodéus M, Hubinont C, Bernard P, Bouckaert A, Thomas K, Goubau P. Prenatal diagnosis of human cytomegalovirus by culture and polymerase chain reaction: 98 pregnancies leading to congenital infection. *Prenat Diagn.* avr 1999;19(4):314-7.
105. La Torre R, Nigro G, Mazzocco M, Best AM, Adler SP. Placental enlargement in women with primary maternal cytomegalovirus infection is associated with fetal and neonatal disease. *Clin Infect Dis Off Publ Infect Dis Soc Am.* 15 oct 2006;43(8):994-1000.
106. Mazon M-C, Alain S, Leruez-Ville M, Schnepf N. Infections à cytomégaloVirus. *EMC - Mal Infect.* janv 2009;6(2):1-19.
107. Revello MG, Zavattoni M, Furione M, Lilleri D, Gorini G, Gerna G. Diagnosis and outcome of preconceptional and periconceptional primary human cytomegalovirus infections. *J Infect Dis.* 15 août 2002;186(4):553-7.
108. Liesnard C, Donner C, Brancart F, Gosselin F, Delforge ML, Rodesch F. Prenatal diagnosis of congenital cytomegalovirus infection: prospective study of 237 pregnancies at risk. *Obstet Gynecol.* juin 2000;95(6 Pt 1):881-8.
109. Enders G, Bäder U, Lindemann L, Schalasta G, Daiminger A. Prenatal diagnosis of congenital cytomegalovirus infection in 189 pregnancies with known outcome. *Prenat Diagn.* mai 2001;21(5):362-77.
110. Bilavsky E, Pardo J, Attias J, Levy I, Magny J-F, Ville Y, et al. Clinical Implications for Children Born with Congenital Cytomegalovirus Infection Following a Negative Amniocentesis. *Clin Infect Dis Off Publ Infect Dis Soc Am.* 24 avr 2016;
111. Halwachs-Baumann G, Genser B, Pailer S, Engele H, Rosegger H, Schalk A, et al. Human cytomegalovirus load in various body fluids of congenitally infected newborns. *J Clin Virol Off Publ Pan Am Soc Clin Virol.* déc 2002;25 Suppl 3:S81-87.
112. Boppana SB, Ross SA, Shimamura M, Palmer AL, Ahmed A, Michaels MG, et al. Saliva polymerase-chain-reaction assay for cytomegalovirus screening in newborns. *N Engl J Med.* 2 juin 2011;364(22):2111-8.
113. Yamamoto AY, Mussi-Pinhata MM, Marin LJ, Brito RM, Oliveira PFC, Coelho TB. Is saliva as reliable as urine for detection of cytomegalovirus DNA for neonatal screening of congenital CMV infection? *J Clin Virol Off Publ Pan Am Soc Clin Virol.* juill 2006;36(3):228-30.
114. Boppana SB, Ross SA, Novak Z, Shimamura M, Tolan RW, Palmer AL, et al. Dried blood spot real-time polymerase chain reaction assays to screen newborns for congenital cytomegalovirus infection. *JAMA.* 14 avr 2010;303(14):1375-82.
115. Leruez-Ville M, Vauloup-Fellous C, Couderc S, Parat S, Castel C, Avettand-Fenoel V, et al. Prospective Identification of Congenital Cytomegalovirus Infection in Newborns Using Real-Time Polymerase Chain Reaction Assays in Dried Blood Spots. *Clin Infect Dis.* 3 janv 2011;52(5):575-81.

116. Noyola DE, Demmler GJ, Nelson CT, Griesser C, Williamson WD, Atkins JT, et al. Early predictors of neurodevelopmental outcome in symptomatic congenital cytomegalovirus infection. *J Pediatr.* mars 2001;138(3):325-31.
117. Ancora G, Lanari M, Lazzarotto T, Venturi V, Tridapalli E, Sandri F, et al. Cranial ultrasound scanning and prediction of outcome in newborns with congenital cytomegalovirus infection. *J Pediatr.* févr 2007;150(2):157-61.
118. Benoist G, Salomon LJ, Mohlo M, Suarez B, Jacquemard F, Ville Y. Cytomegalovirus-related fetal brain lesions: comparison between targeted ultrasound examination and magnetic resonance imaging. *Ultrasound Obstet Gynecol Off J Int Soc Ultrasound Obstet Gynecol.* déc 2008;32(7):900-5.
119. Picone O, Simon I, Benachi A, Brunelle F, Sonigo P. Comparison between ultrasound and magnetic resonance imaging in assessment of fetal cytomegalovirus infection. *Prenat Diagn.* août 2008;28(8):753-8.
120. Farkas N, Hoffmann C, Ben-Sira L, Lev D, Schweiger A, Kidron D, et al. Does normal fetal brain ultrasound predict normal neurodevelopmental outcome in congenital cytomegalovirus infection? *Prenat Diagn.* avr 2011;31(4):360-6.
121. Lipitz S, Yinon Y, Malinger G, Yagel S, Levit L, Hoffman C, et al. Risk of cytomegalovirus-associated sequelae in relation to time of infection and findings on prenatal imaging. *Ultrasound Obstet Gynecol Off J Int Soc Ultrasound Obstet Gynecol.* mai 2013;41(5):508-14.
122. Fabbri E, Revello MG, Furione M, Zavattoni M, Lilleri D, Tassis B, et al. Prognostic markers of symptomatic congenital human cytomegalovirus infection in fetal blood. *BJOG Int J Obstet Gynaecol.* mars 2011;118(4):448-56.
123. Emery VC, Sabin CA, Cope AV, Gor D, Hassan-Walker AF, Griffiths PD. Application of viral-load kinetics to identify patients who develop cytomegalovirus disease after transplantation. *Lancet Lond Engl.* 10 juin 2000;355(9220):2032-6.
124. Micol R, Buchy P, Guerrier G, Duong V, Ferradini L, Dousset J-P, et al. Prevalence, risk factors, and impact on outcome of cytomegalovirus replication in serum of Cambodian HIV-infected patients (2004-2007). *J Acquir Immune Defic Syndr* 1999. 1 août 2009;51(4):486-91.
125. Kotton CN, Kumar D, Caliendo AM, Asberg A, Chou S, Danziger-Isakov L, et al. Updated international consensus guidelines on the management of cytomegalovirus in solid-organ transplantation. *Transplantation.* 27 août 2013;96(4):333-60.
126. Hirsch HH, Lautenschlager I, Pinsky BA, Cardeñoso L, Aslam S, Cobb B, et al. An International Multicenter Performance Analysis of CMV Viral Load Tests. *Clin Infect Dis.* 24 oct 2012;cis900.
127. Picone O, Costa J-M, Leruez-Ville M, Ernault P, Olivi M, Ville Y. Cytomegalovirus (CMV) glycoprotein B genotype and CMV DNA load in the amniotic fluid of infected fetuses. *Prenat Diagn.* 15 déc 2004;24(12):1001-6.

128. Revello MG, Zavattoni M, Furione M, Baldanti F, Gerna G. Quantification of human cytomegalovirus DNA in amniotic fluid of mothers of congenitally infected fetuses. *J Clin Microbiol.* oct 1999;37(10):3350-2.
129. Gouarin S, Gault E, Vabret A, Cointe D, Rozenberg F, Grangeot-Keros L, et al. Real-time PCR quantification of human cytomegalovirus DNA in amniotic fluid samples from mothers with primary infection. *J Clin Microbiol.* mai 2002;40(5):1767-72.
130. Leruez-Ville M, Ville Y. [Cytomegalovirus infection in pregnancy]. *Presse Médicale Paris Fr* 1983. juin 2014;43(6 Pt 1):683-90.
131. Nigro G, Adler SP, La Torre R, Best AM, Congenital Cytomegalovirus Collaborating Group. Passive immunization during pregnancy for congenital cytomegalovirus infection. *N Engl J Med.* 29 sept 2005;353(13):1350-62.
132. Revello MG, Lazzarotto T, Guerra B, Spinillo A, Ferrazzi E, Kustermann A, et al. A Randomized Trial of Hyperimmune Globulin to Prevent Congenital Cytomegalovirus. *N Engl J Med.* 3 avr 2014;370(14):1316-26.
133. Whitley RJ. The use of antiviral drugs during the neonatal period. *Clin Perinatol.* mars 2012;39(1):69-81.
134. Whitley RJ, Cloud G, Gruber W, Storch GA, Demmler GJ, Jacobs RF, et al. Ganciclovir treatment of symptomatic congenital cytomegalovirus infection: results of a phase II study. National Institute of Allergy and Infectious Diseases Collaborative Antiviral Study Group. *J Infect Dis.* mai 1997;175(5):1080-6.
135. Kimberlin DW, Lin C-Y, Sánchez PJ, Demmler GJ, Dankner W, Shelton M, et al. Effect of ganciclovir therapy on hearing in symptomatic congenital cytomegalovirus disease involving the central nervous system: a randomized, controlled trial. *J Pediatr.* juill 2003;143(1):16-25.
136. Michaels MG. Treatment of congenital cytomegalovirus: where are we now? *Expert Rev Anti Infect Ther.* juin 2007;5(3):441-8.
137. Beutner KR. Valacyclovir: a review of its antiviral activity, pharmacokinetic properties, and clinical efficacy. *Antiviral Res.* déc 1995;28(4):281-90.
138. Bell AR. Valaciclovir update. *Adv Exp Med Biol.* 1999;458:149-57.
139. Pasternak B, Hviid A. Use of acyclovir, valacyclovir, and famciclovir in the first trimester of pregnancy and the risk of birth defects. *JAMA.* 25 août 2010;304(8):859-66.
140. Jacquemard F, Yamamoto M, Costa J-M, Romand S, Jaqz-Aigrain E, Dejean A, et al. Maternal administration of valaciclovir in symptomatic intrauterine cytomegalovirus infection. *BJOG Int J Obstet Gynaecol.* sept 2007;114(9):1113-21.
141. Leruez-Ville M, Ghout I, Bussièrès L, Stirnemann J, Magny J-F, Couderc S, et al. In utero treatment of congenital cytomegalovirus infection with valacyclovir in a multicenter, open-label, phase II study. *Am J Obstet Gynecol.* 13 avr 2016;

142. Nigro G, Scholz H, Bartmann U. Ganciclovir therapy for symptomatic congenital cytomegalovirus infection in infants: a two-regimen experience. *J Pediatr.* févr 1994;124(2):318-22.
143. Boehme KW, Guerrero M, Compton T. Human cytomegalovirus envelope glycoproteins B and H are necessary for TLR2 activation in permissive cells. *J Immunol Baltim Md 1950.* 15 nov 2006;177(10):7094-102.
144. Kijittayarit S, Eid AJ, Brown RA, Paya CV, Razonable RR. Relationship between Toll-like receptor 2 polymorphism and cytomegalovirus disease after liver transplantation. *Clin Infect Dis Off Publ Infect Dis Soc Am.* 15 mai 2007;44(10):1315-20.
145. Tabeta K, Georgel P, Janssen E, Du X, Hoebe K, Crozat K, et al. Toll-like receptors 9 and 3 as essential components of innate immune defense against mouse cytomegalovirus infection. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 9 mars 2004;101(10):3516-21.
146. Schleiss MR. Cytomegalovirus in the Neonate: Immune Correlates of Infection and Protection. *Clin Dev Immunol [Internet].* 2013 [cité 17 déc 2015];2013. Disponible sur: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3760263/>
147. Compton T, Kurt-Jones EA, Boehme KW, Belko J, Latz E, Golenbock DT, et al. Human cytomegalovirus activates inflammatory cytokine responses via CD14 and Toll-like receptor 2. *J Virol.* avr 2003;77(8):4588-96.
148. Carlier J, Martin H, Mariamé B, Rauwel B, Mengelle C, Weclawiak H, et al. Paracrine inhibition of GM-CSF signaling by human cytomegalovirus in monocytes differentiating to dendritic cells. *Blood.* 22 déc 2011;118(26):6783-92.
149. Moutaftsi M, Mehl AM, Borysiewicz LK, Tabi Z. Human cytomegalovirus inhibits maturation and impairs function of monocyte-derived dendritic cells. *Blood.* 15 avr 2002;99(8):2913-21.
150. Hertel L, Lacaille VG, Strobl H, Mellins ED, Mocarski ES. Susceptibility of immature and mature Langerhans cell-type dendritic cells to infection and immunomodulation by human cytomegalovirus. *J Virol.* juill 2003;77(13):7563-74.
151. McDonagh S, Maidji E, Chang H-T, Pereira L. Patterns of human cytomegalovirus infection in term placentas: a preliminary analysis. *J Clin Virol Off Publ Pan Am Soc Clin Virol.* févr 2006;35(2):210-5.
152. Weisblum Y, Panet A, Zakay-Rones Z, Haimov-Kochman R, Goldman-Wohl D, Ariel I, et al. Modeling of human cytomegalovirus maternal-fetal transmission in a novel decidual organ culture. *J Virol.* déc 2011;85(24):13204-13.
153. Bácsi A, Aranyosi J, Beck Z, Ebbesen P, Andirkó I, Szabó J, et al. Placental macrophage contact potentiates the complete replicative cycle of human cytomegalovirus in syncytiotrophoblast cells: role of interleukin-8 and transforming growth factor-beta1. *J Interferon Cytokine Res Off J Int Soc Interferon Cytokine Res.* oct 1999;19(10):1153-60.

154. Huygens A, Dauby N, Vermijlen D, Marchant A. Immunity to Cytomegalovirus in Early Life. *Front Immunol* [Internet]. 30 oct 2014 [cité 21 mars 2016];5. Disponible sur: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4214201/>
155. Siewiera J, El Costa H, Tabiasco J, Berrebi A, Cartron G, Le Bouteiller P, et al. Human cytomegalovirus infection elicits new decidual natural killer cell effector functions. *PLoS Pathog*. 2013;9(4):e1003257.
156. Le Bouteiller P, Siewiera J, Casart Y, Aguerre-Girr M, El Costa H, Berrebi A, et al. The human decidual NK-cell response to virus infection: what can we learn from circulating NK lymphocytes? *J Reprod Immunol*. mars 2011;88(2):170-5.
157. Vivier E, Tomasello E, Baratin M, Walzer T, Ugolini S. Functions of natural killer cells. *Nat Immunol*. mai 2008;9(5):503-10.
158. O'Leary JG, Goodarzi M, Drayton DL, von Andrian UH. T cell- and B cell-independent adaptive immunity mediated by natural killer cells. *Nat Immunol*. mai 2006;7(5):507-16.
159. Venema H, van den Berg AP, van Zanten C, van Son WJ, van der Giessen M, The TH. Natural killer cell responses in renal transplant patients with cytomegalovirus infection. *J Med Virol*. févr 1994;42(2):188-92.
160. Jost S, Altfeld M. Control of human viral infections by natural killer cells. *Annu Rev Immunol*. 2013;31:163-94.
161. Mandelboim O, Porgador A. NKp46. *Int J Biochem Cell Biol*. déc 2001;33(12):1147-50.
162. Sivori S, Vitale M, Morelli L, Sanseverino L, Augugliaro R, Bottino C, et al. p46, a novel natural killer cell-specific surface molecule that mediates cell activation. *J Exp Med*. 6 oct 1997;186(7):1129-36.
163. Gumá M, Angulo A, Vilches C, Gómez-Lozano N, Malats N, López-Botet M. Imprint of human cytomegalovirus infection on the NK cell receptor repertoire. *Blood*. 1 déc 2004;104(12):3664-71.
164. Rölle A, Pollmann J, Ewen E-M, Le VTK, Halenius A, Hengel H, et al. IL-12-producing monocytes and HLA-E control HCMV-driven NKG2C+ NK cell expansion. *J Clin Invest*. déc 2014;124(12):5305-16.
165. Tomasec P, Braud VM, Rickards C, Powell MB, McSharry BP, Gadola S, et al. Surface expression of HLA-E, an inhibitor of natural killer cells, enhanced by human cytomegalovirus gpUL40. *Science*. 11 févr 2000;287(5455):1031.
166. Foley B, Cooley S, Verneris MR, Curtsinger J, Luo X, Waller EK, et al. Human CMV-induced Memory-like NKG2C+ NK cells are Transplantable and Expand in vivo in Response to Recipient CMV Antigen. *J Immunol Baltim Md 1950*. 15 nov 2012;189(10):5082-8.

167. Della Chiesa M, Falco M, Podestà M, Locatelli F, Moretta L, Frassoni F, et al. Phenotypic and functional heterogeneity of human NK cells developing after umbilical cord blood transplantation: a role for human cytomegalovirus? *Blood*. 12 janv 2012;119(2):399-410.
168. Gumá M, Budt M, Sáez A, Brckalo T, Hengel H, Angulo A, et al. Expansion of CD94/NKG2C+ NK cells in response to human cytomegalovirus-infected fibroblasts. *Blood*. 1 mai 2006;107(9):3624-31.
169. Rölle A, Brodin P. Immune Adaptation to Environmental Influence: The Case of NK Cells and HCMV. *Trends Immunol*. mars 2016;37(3):233-43.
170. Noyola DE, Alarcón A, Noguera-Julian A, Muntasell A, Muñoz-Almagro C, García J, et al. Dynamics of the NK-cell subset redistribution induced by cytomegalovirus infection in preterm infants. *Hum Immunol*. mars 2015;76(2-3):118-23.
171. Béziat V, Liu LL, Malmberg J-A, Ivarsson MA, Sohlberg E, Björklund AT, et al. NK cell responses to cytomegalovirus infection lead to stable imprints in the human KIR repertoire and involve activating KIRs. *Blood*. 4 avr 2013;121(14):2678-88.
172. Sun JC, Lanier LL. The Natural Selection of Herpesviruses and Virus-Specific NK Cell Receptors. *Viruses*. 2009;1(3):362.
173. Noyola DE, Fortuny C, Muntasell A, Noguera-Julian A, Muñoz-Almagro C, Alarcón A, et al. Influence of congenital human cytomegalovirus infection and the NKG2C genotype on NK-cell subset distribution in children. *Eur J Immunol*. déc 2012;42(12):3256-66.
174. Koopman LA, Kopcow HD, Rybalov B, Boyson JE, Orange JS, Schatz F, et al. Human decidual natural killer cells are a unique NK cell subset with immunomodulatory potential. *J Exp Med*. 20 oct 2003;198(8):1201-12.
175. Saito S. Cytokine network at the feto-maternal interface. *J Reprod Immunol*. juill 2000;47(2):87-103.
176. van Leeuwen EMM, Remmerswaal EBM, Vossen MTM, Rowshani AT, Wertheim-van Dillen PME, van Lier RAW, et al. Emergence of a CD4+CD28- granzyme B+, cytomegalovirus-specific T cell subset after recovery of primary cytomegalovirus infection. *J Immunol Baltim Md 1950*. 1 août 2004;173(3):1834-41.
177. Appay V, Rowland-Jones SL. Lessons from the study of T-cell differentiation in persistent human virus infection. *Semin Immunol*. juin 2004;16(3):205-12.
178. Rentenaar RJ, Gamadia LE, van DerHoek N, van Diepen FN, Boom R, Weel JF, et al. Development of virus-specific CD4(+) T cells during primary cytomegalovirus infection. *J Clin Invest*. févr 2000;105(4):541-8.
179. Scott GM, Chow SSW, Craig ME, Pang CNI, Hall B, Wilkins MR, et al. Cytomegalovirus Infection During Pregnancy With Maternofetal Transmission Induces a

Proinflammatory Cytokine Bias in Placenta and Amniotic Fluid. *J Infect Dis.* 15 avr 2012;205(8):1305-10.

180. Sester U, Presser D, Dirks J, Gärtner BC, Köhler H, Sester M. PD-1 expression and IL-2 loss of cytomegalovirus-specific T cells correlates with viremia and reversible functional anergy. *Am J Transplant Off J Am Soc Transplant Am Soc Transpl Surg.* juill 2008;8(7):1486-97.
181. Tu W, Chen S, Sharp M, Dekker C, Manganello AM, Tongson EC, et al. Persistent and selective deficiency of CD4+ T cell immunity to cytomegalovirus in immunocompetent young children. *J Immunol Baltim Md 1950.* 1 mars 2004;172(5):3260-7.
182. Elbou Ould MA, Luton D, Yadini M, Pedron B, Aujard Y, Jacqz-Aigrain E, et al. Cellular immune response of fetuses to cytomegalovirus. *Pediatr Res.* févr 2004;55(2):280-6.
183. Huygens A, Lecomte S, Tackoen M, Olislagers V, Delmarcelle Y, Burny W, et al. Functional Exhaustion Limits CD4+ and CD8+ T-Cell Responses to Congenital Cytomegalovirus Infection. *J Infect Dis.* 1 août 2015;212(3):484-94.
184. Iwai Y, Terawaki S, Ikegawa M, Okazaki T, Honjo T. PD-1 inhibits antiviral immunity at the effector phase in the liver. *J Exp Med.* 7 juill 2003;198(1):39-50.
185. Freeman GJ, Long AJ, Iwai Y, Bourque K, Chernova T, Nishimura H, et al. Engagement of the PD-1 immunoinhibitory receptor by a novel B7 family member leads to negative regulation of lymphocyte activation. *J Exp Med.* 2 oct 2000;192(7):1027-34.
186. Dong H, Zhu G, Tamada K, Chen L. B7-H1, a third member of the B7 family, co-stimulates T-cell proliferation and interleukin-10 secretion. *Nat Med.* déc 1999;5(12):1365-9.
187. Eppihimer MJ, Gunn J, Freeman GJ, Greenfield EA, Chernova T, Erickson J, et al. Expression and regulation of the PD-L1 immunoinhibitory molecule on microvascular endothelial cells. *Microcirc N Y N 1994.* avr 2002;9(2):133-45.
188. Thibult M-L, Mamessier E, Gertner-Dardenne J, Pastor S, Just-Landi S, Xerri L, et al. PD-1 is a novel regulator of human B-cell activation. *Int Immunol.* févr 2013;25(2):129-37.
189. Zdrenghea MT, Johnston SL. Role of PD-L1/PD-1 in the immune response to respiratory viral infections. *Microbes Infect Inst Pasteur.* juin 2012;14(6):495-9.
190. Ji M, Liu Y, Li Q, Li X-D, Zhao W-Q, Zhang H, et al. PD-1/PD-L1 pathway in non-small-cell lung cancer and its relation with EGFR mutation. *J Transl Med [Internet].* 16 janv 2015 [cité 21 mars 2016];13. Disponible sur: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4302082/>
191. Schachtele SJ, Hu S, Sheng WS, Mutnal MB, Lokensgard JR. Glial cells suppress postencephalitic CD8+ T lymphocytes through PD-L1. *Glia.* oct 2014;62(10):1582-94.

192. Rasmussen L, Matkin C, Spaete R, Pacht C, Merigan TC. Antibody response to human cytomegalovirus glycoproteins gB and gH after natural infection in humans. *J Infect Dis.* nov 1991;164(5):835-42.
193. Britt WJ. Recent advances in the identification of significant human cytomegalovirus-encoded proteins. *Transplant Proc.* juin 1991;23(3 Suppl 3):64-69, discussion 69.
194. Wirtz N, Schader SI, Holtappels R, Simon CO, Lemmermann NAW, Reddehase MJ, et al. Polyclonal cytomegalovirus-specific antibodies not only prevent virus dissemination from the portal of entry but also inhibit focal virus spread within target tissues. *Med Microbiol Immunol (Berl).* juin 2008;197(2):151-8.
195. Jonjić S, Pavić I, Polić B, Crnković I, Lucin P, Koszinowski UH. Antibodies are not essential for the resolution of primary cytomegalovirus infection but limit dissemination of recurrent virus. *J Exp Med.* 1 mai 1994;179(5):1713-7.
196. Chatterjee A, Harrison CJ, Britt WJ, Bewtra C. Modification of maternal and congenital cytomegalovirus infection by anti-glycoprotein b antibody transfer in guinea pigs. *J Infect Dis.* 1 juin 2001;183(11):1547-53.
197. Boppana SB, Britt WJ. Antiviral Antibody Responses and Intrauterine Transmission after Primary Maternal Cytomegalovirus Infection. *J Infect Dis.* 5 janv 1995;171(5):1115-21.
198. Lilleri D, Kabanova A, Revello MG, Percivalle E, Sarasini A, Genini E, et al. Fetal human cytomegalovirus transmission correlates with delayed maternal antibodies to gH/gL/pUL128-130-131 complex during primary infection. *PloS One.* 2013;8(3):e59863.
199. Yeager AS, Grumet FC, Hafleigh EB, Arvin AM, Bradley JS, Prober CG. Prevention of transfusion-acquired cytomegalovirus infections in newborn infants. *J Pediatr.* févr 1981;98(2):281-7.
200. Hassan J, Dooley S, Hall W. Immunological response to cytomegalovirus in congenitally infected neonates. *Clin Exp Immunol.* mars 2007;147(3):465-71.
201. Volpe J. In Volpes J ed. *Neurology of the newborn*, fourth edition. Philadelphia . W.B. Saunders Co. 2001. 45-99 p.
202. Cheeran MC-J, Mutnal MB, Hu S, Armien A, Lokensgard JR. Reduced lymphocyte infiltration during cytomegalovirus brain infection of interleukin-10-deficient mice. *J Neurovirol.* 2009;15(4):334-42.
203. Stiles J, Jernigan TL. The basics of brain development. *Neuropsychol Rev.* déc 2010;20(4):327-48.
204. Spalice A, Parisi P, Nicita F, Pizzardi G, Del Balzo F, Iannetti P. Neuronal migration disorders: clinical, neuroradiologic and genetics aspects. *Acta Paediatr Oslo Nor* 1992. mars 2009;98(3):421-33.

205. McManus MF, Golden JA. Neuronal migration in developmental disorders. *J Child Neurol.* avr 2005;20(4):280-6.
206. Gressens P. Pathogenesis of migration disorders. *Curr Opin Neurol.* avr 2006;19(2):135-40.
207. Engman M-L. Cytomegalovirus and herpes simplex virus infections in the fetus and newborn infant, with regard to neurodevelopmental disabilities [Internet]. Institutionen för klinisk vetenskap / Department of Clinical Sciences; 2010 [cité 5 févr 2016]. Disponible sur: <http://openarchive.ki.se/xmlui/handle/10616/39633>
208. Louvi A, Artavanis-Tsakonas S. Notch signalling in vertebrate neural development. *Nat Rev Neurosci.* févr 2006;7(2):93-102.
209. Maccarrone M, Guzmán M, Mackie K, Doherty P, Harkany T. Programming of neural cells by (endo)cannabinoids: from physiological rules to emerging therapies. *Nat Rev Neurosci.* déc 2014;15(12):786-801.
210. Dehay C, Kennedy H. Cell-cycle control and cortical development. *Nat Rev Neurosci.* juin 2007;8(6):438-50.
211. Lukaszewicz A, Savatier P, Cortay V, Giroud P, Huissoud C, Berland M, et al. G1 phase regulation, area-specific cell cycle control, and cytoarchitectonics in the primate cortex. *Neuron.* 4 août 2005;47(3):353-64.
212. Lagercrantz H, Ringstedt T. Organization of the neuronal circuits in the central nervous system during development. *Acta Pædiatrica.* 1 juill 2001;90(7):707-15.
213. Alvarez-Buylla A, García-Verdugo JM, Tramontin AD. A unified hypothesis on the lineage of neural stem cells. *Nat Rev Neurosci.* avr 2001;2(4):287-93.
214. Bonfanti L, Peretto P. Radial glial origin of the adult neural stem cells in the subventricular zone. *Prog Neurobiol.* sept 2007;83(1):24-36.
215. von Bohlen Und Halbach O. Immunohistological markers for staging neurogenesis in adult hippocampus. *Cell Tissue Res.* sept 2007;329(3):409-20.
216. Zhang J, Jiao J. Molecular Biomarkers for Embryonic and Adult Neural Stem Cell and Neurogenesis. *BioMed Res Int.* 2015;2015:727542.
217. Hockfield S, McKay RD. Identification of major cell classes in the developing mammalian nervous system. *J Neurosci Off J Soc Neurosci.* déc 1985;5(12):3310-28.
218. Lendahl U, Zimmerman LB, McKay RD. CNS stem cells express a new class of intermediate filament protein. *Cell.* 23 févr 1990;60(4):585-95.
219. Liu C, Zhong Y, Apostolou A, Fang S. Neural differentiation of human embryonic stem cells as an in vitro tool for the study of the expression patterns of the neuronal cytoskeleton during neurogenesis. *Biochem Biophys Res Commun.* 13 sept 2013;439(1):154-9.

220. 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.
221. Yin X, Li L, Zhang X, Yang Y, Chai Y, Han X, et al. Development of neural stem cells at different sites of fetus brain of different gestational age. *Int J Clin Exp Pathol*. 2013;6(12):2757-64.
222. Parent JM, Yu TW, Leibowitz RT, Geschwind DH, Sloviter RS, Lowenstein DH. Dentate granule cell neurogenesis is increased by seizures and contributes to aberrant network reorganization in the adult rat hippocampus. *J Neurosci Off J Soc Neurosci*. 15 mai 1997;17(10):3727-38.
223. Doetsch F, García-Verdugo JM, Alvarez-Buylla A. Cellular composition and three-dimensional organization of the subventricular germinal zone in the adult mammalian brain. *J Neurosci Off J Soc Neurosci*. 1 juill 1997;17(13):5046-61.
224. Yang HKC, Sundholm-Peters NL, Goings GE, Walker AS, Hyland K, Szele FG. Distribution of doublecortin expressing cells near the lateral ventricles in the adult mouse brain. *J Neurosci Res*. 1 mai 2004;76(3):282-95.
225. von Bohlen und Halbach O. Immunohistological markers for proliferative events, gliogenesis, and neurogenesis within the adult hippocampus. *Cell Tissue Res*. juill 2011;345(1):1-19.
226. Nakamura Y, Yamamoto M, Oda E, Yamamoto A, Kanemura Y, Hara M, et al. Expression of tubulin beta II in neural stem/progenitor cells and radial fibers during human fetal brain development. *Lab Investig J Tech Methods Pathol*. avr 2003;83(4):479-89.
227. Sarnat HB. Regional differentiation of the human fetal ependyma: immunocytochemical markers. *J Neuropathol Exp Neurol*. janv 1992;51(1):58-75.
228. Wisniewska-Kruk J, Hoeben KA, Vogels IMC, Gaillard PJ, Van Noorden CJF, Schlingemann RO, et al. A novel co-culture model of the blood-retinal barrier based on primary retinal endothelial cells, pericytes and astrocytes. *Exp Eye Res*. mars 2012;96(1):181-90.
229. Cox-Limpens KEM, Strackx E, Van den Hove DLA, Van Ekkendonk JRA, Jong M de, Zimmermann LJI, et al. Fetal asphyctic preconditioning protects against perinatal asphyxia-induced apoptosis and astrogliosis in neonatal brain. *CNS Neurol Disord Drug Targets*. 2015;14(1):33-40.
230. Looney A-M, Ahearne C, Boylan GB, Murray DM. Glial Fibrillary Acidic Protein Is Not an Early Marker of Injury in Perinatal Asphyxia and Hypoxic-Ischemic Encephalopathy. *Front Neurol*. 2015;6:264.
231. Brahmachari S, Fung YK, Pahan K. Induction of Glial Fibrillary Acidic Protein Expression in Astrocytes by Nitric Oxide. *J Neurosci*. 5 mars 2006;26(18):4930-9.

232. Rieske P, Azizi SA, Augelli B, Gaughan J, Krynska B. A population of human brain parenchymal cells express markers of glial, neuronal and early neural cells and differentiate into cells of neuronal and glial lineages. *Eur J Neurosci.* janv 2007;25(1):31-7.
233. Dráberová E, Del Valle L, Gordon J, Marková V, Smejkalová B, Bertrand L, et al. Class III beta-tubulin is constitutively coexpressed with glial fibrillary acidic protein and nestin in midgestational human fetal astrocytes: implications for phenotypic identity. *J Neuropathol Exp Neurol.* avr 2008;67(4):341-54.
234. Rubin LL, Hall DE, Porter S, Barbu K, Cannon C, Horner HC, et al. A cell culture model of the blood-brain barrier. *J Cell Biol.* déc 1991;115(6):1725-35.
235. Cecchelli R, Berezowski V, Lundquist S, Culot M, Renftel M, Dehouck M-P, et al. Modelling of the blood-brain barrier in drug discovery and development. *Nat Rev Drug Discov.* août 2007;6(8):650-61.
236. Deli MA, Abrahám CS, Kataoka Y, Niwa M. Permeability studies on in vitro blood-brain barrier models: physiology, pathology, and pharmacology. *Cell Mol Neurobiol.* févr 2005;25(1):59-127.
237. Nakagawa S, Deli MA, Nakao S, Honda M, Hayashi K, Nakaoka R, et al. Pericytes from brain microvessels strengthen the barrier integrity in primary cultures of rat brain endothelial cells. *Cell Mol Neurobiol.* sept 2007;27(6):687-94.
238. Nakagawa S, Deli MA, Kawaguchi H, Shimizudani T, Shimono T, Kittel A, et al. A new blood-brain barrier model using primary rat brain endothelial cells, pericytes and astrocytes. *Neurochem Int.* avr 2009;54(3-4):253-63.
239. Maki T, Maeda M, Uemura M, Lo EK, Terasaki Y, Liang AC, et al. Potential interactions between pericytes and oligodendrocyte precursor cells in perivascular regions of cerebral white matter. *Neurosci Lett.* 15 juin 2015;597:164-9.
240. Dore-Duffy P, Balabanov R, Beaumont T, Katar M. The CNS pericyte response to low oxygen: early synthesis of cyclopentenone prostaglandins of the J-series. *Microvasc Res.* janv 2005;69(1-2):79-88.
241. Hutter-Schmid B, Humpel C. Platelet-derived Growth Factor Receptor-beta is Differentially Regulated in Primary Mouse Pericytes and Brain Slices. *Curr Neurovasc Res.* 2016;13(2):127-34.
242. Wang JD, Khafagy E-S, Khanafer K, Takayama S, ElSayed MEH. Organization of Endothelial Cells, Pericytes, and Astrocytes into a 3D Microfluidic in Vitro Model of the Blood-Brain Barrier. *Mol Pharm.* 7 mars 2016;13(3):895-906.
243. Nakamura K, Arimura K, Nishimura A, Tachibana M, Yoshikawa Y, Makihara N, et al. Possible involvement of basic FGF in the upregulation of PDGFR β in pericytes after ischemic stroke. *Brain Res.* 1 janv 2016;1630:98-108.

244. Zheng Y, Yamamoto S, Ishii Y, Sang Y, Hamashima T, Van De N, et al. Glioma-Derived Platelet-Derived Growth Factor-BB Recruits Oligodendrocyte Progenitor Cells via Platelet-Derived Growth Factor Receptor- α and Remodels Cancer Stroma. *Am J Pathol*. 3 mars 2016;
245. Chen Y-J, Zhang J-X, Shen L, Qi Q, Cheng X-X, Zhong Z-R, et al. Schwann cells induce Proliferation and Migration of Oligodendrocyte Precursor Cells Through Secretion of PDGF-AA and FGF-2. *J Mol Neurosci MN*. août 2015;56(4):999-1008.
246. Nishikawa SI, Nishikawa S, Kawamoto H, Yoshida H, Kizumoto M, Kataoka H, et al. In vitro generation of lymphohematopoietic cells from endothelial cells purified from murine embryos. *Immunity*. juin 1998;8(6):761-9.
247. Seguin T, Braun T, Mira J-P. [Endothelial progenitor cells: new biomarkers and potential therapy in intensive care]. *Médecine Mal Infect*. juin 2007;37(6):305-11.
248. Jinno K, Tanimizu M, Hyodo I, Nishikawa Y, Hosokawa Y, Doi T, et al. Circulating vascular endothelial growth factor (VEGF) is a possible tumor marker for metastasis in human hepatocellular carcinoma. *J Gastroenterol*. juin 1998;33(3):376-82.
249. Breier G, Breviario F, Caveda L, Berthier R, Schnürch H, Gotsch U, et al. Molecular cloning and expression of murine vascular endothelial-cadherin in early stage development of cardiovascular system. *Blood*. 15 janv 1996;87(2):630-41.
250. Breier G, Risau W. The role of vascular endothelial growth factor in blood vessel formation. *Trends Cell Biol*. déc 1996;6(12):454-6.
251. Dobyns WB, Elias ER, Newlin AC, Pagon RA, Ledbetter DH. Causal heterogeneity in isolated lissencephaly. *Neurology*. juill 1992;42(7):1375-88.
252. Golden JA. Cell migration and cerebral cortical development. *Neuropathol Appl Neurobiol*. févr 2001;27(1):22-8.
253. Cheeran MC-J, Lokensgard JR, Schleiss MR. Neuropathogenesis of Congenital Cytomegalovirus Infection: Disease Mechanisms and Prospects for Intervention. *Clin Microbiol Rev*. 1 janv 2009;22(1):99-126.
254. Crozat-Teissier N. Modélisation et caractérisation de l'atteinte cochléaire et cérébrale lors de l'infection materno-foetale à CMV. Université Paris Descartes; 2012.
255. Pulliam L, Moore D, West DC. Human cytomegalovirus induces IL-6 and TNF alpha from macrophages and microglial cells: possible role in neurotoxicity. *J Neurovirol*. juin 1995;1(2):219-27.
256. Perlman JM, Argyle C. Lethal cytomegalovirus infection in preterm infants: clinical, radiological, and neuropathological findings. *Ann Neurol*. janv 1992;31(1):64-8.
257. Spiller OB, Borysiewicz LK, Morgan BP. Development of a model for cytomegalovirus infection of oligodendrocytes. *J Gen Virol*. déc 1997;78 (Pt 12):3349-56.

258. Poland SD, Costello P, Dekaban GA, Rice GP. Cytomegalovirus in the brain: in vitro infection of human brain-derived cells. *J Infect Dis.* déc 1990;162(6):1252-62.
259. Lokensgard JR, Cheeran MC, Gekker G, Hu S, Chao CC, Peterson PK. Human cytomegalovirus replication and modulation of apoptosis in astrocytes. *J Hum Virol.* avr 1999;2(2):91-101.
260. Lathey JL, Wiley CA, Verity MA, Nelson JA. Cultured human brain capillary endothelial cells are permissive for infection by human cytomegalovirus. *Virology.* mai 1990;176(1):266-73.
261. Lokensgard JR, Cheeran MC-J, Hu S, Gekker G, Peterson PK. Glial cell responses to herpesvirus infections: role in defense and immunopathogenesis. *J Infect Dis.* 1 déc 2002;186 Suppl 2:S171-179.
262. Cheeran MC-J, Hu S, Ni HT, Sheng W, Palmquist JM, Peterson PK, et al. Neural precursor cell susceptibility to human cytomegalovirus diverges along glial or neuronal differentiation pathways. *J Neurosci Res.* 15 déc 2005;82(6):839-50.
263. McCarthy M, Auger D, Whittemore SR. Human cytomegalovirus causes productive infection and neuronal injury in differentiating fetal human central nervous system neuroepithelial precursor cells. *J Hum Virol.* août 2000;3(4):215-28.
264. Odeberg J, Wolmer N, Falci S, Westgren M, Sundström E, Seiger A, et al. Late human cytomegalovirus (HCMV) proteins inhibit differentiation of human neural precursor cells into astrocytes. *J Neurosci Res.* 15 févr 2007;85(3):583-93.
265. 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.* avr 2010;84(7):3528-41.
266. Teissier N, Fallet-Bianco C, Delezoide A-L, Laquerrière A, Marcorelles P, Khung-Savatovsky S, et al. Cytomegalovirus-induced brain malformations in fetuses. *J Neuropathol Exp Neurol.* févr 2014;73(2):143-58.
267. Alcendor DJ, Charest AM, Zhu WQ, Vigil HE, Knobel SM. Infection and upregulation of proinflammatory cytokines in human brain vascular pericytes by human cytomegalovirus. *J Neuroinflammation.* 2012;9:95.
268. Ho WSC, van den Pol AN. Bystander attenuation of neuronal and astrocyte intercellular communication by murine cytomegalovirus infection of glia. *J Virol.* juill 2007;81(13):7286-92.
269. van Den Pol AN, Mocarski E, Saederup N, Vieira J, Meier TJ. Cytomegalovirus cell tropism, replication, and gene transfer in brain. *J Neurosci Off J Soc Neurosci.* 15 déc 1999;19(24):10948-65.
270. Kawasaki H, Kosugi I, Arai Y, Tsutsui Y. The amount of immature glial cells in organotypic brain slices determines the susceptibility to murine cytomegalovirus infection. *Lab Invest J Tech Methods Pathol.* oct 2002;82(10):1347-58.

271. Mutnal MB, Cheeran MC-J, Hu S, Lokensgard JR. Murine Cytomegalovirus Infection of Neural Stem Cells Alters Neurogenesis in the Developing Brain. PLoS ONE [Internet]. 13 janv 2011 [cité 1 avr 2015];6(1). Disponible sur: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3020957/>
272. Kosugi I, Kawasaki H, Arai Y, Tsutsui Y. Innate immune responses to cytomegalovirus infection in the developing mouse brain and their evasion by virus-infected neurons. *Am J Pathol.* sept 2002;161(3):919-28.
273. Lünemann A, Lünemann JD, Roberts S, Messmer B, Barreira da Silva R, Raine CS, et al. Human NK cells kill resting but not activated microglia via NKG2D- and NKp46-mediated recognition. *J Immunol Baltim Md 1950.* 1 nov 2008;181(9):6170-7.
274. Bantug GRB, Cekinovic D, Bradford R, Koontz T, Jonjic S, Britt WJ. CD8+ T lymphocytes control murine cytomegalovirus replication in the central nervous system of newborn animals. *J Immunol Baltim Md 1950.* 1 août 2008;181(3):2111-23.
275. Gabrielli L, Bonasoni MP, Santini D, Piccirilli G, Chiereghin A, Petrisli E, et al. Congenital cytomegalovirus infection: patterns of fetal brain damage. *Clin Microbiol Infect Off Publ Eur Soc Clin Microbiol Infect Dis.* oct 2012;18(10):E419-427.
276. Mutnal MB, Hu S, Lokensgard JR. Persistent Humoral Immune Responses in the CNS Limit Recovery of Reactivated Murine Cytomegalovirus. PLoS ONE. 6 mars 2012;7(3):e33143.
277. Cekinović D, Golemac M, Pugel EP, Tomac J, Cicin-Sain L, Slavuljica I, et al. Passive immunization reduces murine cytomegalovirus-induced brain pathology in newborn mice. *J Virol.* déc 2008;82(24):12172-80.
278. Das S, Basu A. Inflammation: a new candidate in modulating adult neurogenesis. *J Neurosci Res.* 1 mai 2008;86(6):1199-208.
279. Borsini A, Zunszain PA, Thuret S, Pariante CM. The role of inflammatory cytokines as key modulators of neurogenesis. *Trends Neurosci.* mars 2015;38(3):145-57.
280. Nuzzo D, Picone P, Caruana L, Vasto S, Barera A, Caruso C, et al. Inflammatory mediators as biomarkers in brain disorders. *Inflammation.* juin 2014;37(3):639-48.
281. Monson NL, Ireland SJ, Ligocki AJ, Chen D, Rounds WH, Li M, et al. Elevated CNS inflammation in patients with preclinical Alzheimer's disease. *J Cereb Blood Flow Metab Off J Int Soc Cereb Blood Flow Metab.* janv 2014;34(1):30-3.
282. Ling ZD, Potter ED, Lipton JW, Carvey PM. Differentiation of mesencephalic progenitor cells into dopaminergic neurons by cytokines. *Exp Neurol.* févr 1998;149(2):411-23.
283. Crampton SJ, Collins LM, Toulouse A, Nolan YM, O'Keeffe GW. Exposure of foetal neural progenitor cells to IL-1 β impairs their proliferation and alters their differentiation - a role for maternal inflammation? *J Neurochem.* mars 2012;120(6):964-73.

284. Koo JW, Duman RS. IL-1beta is an essential mediator of the antineurogenic and anhedonic effects of stress. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 15 janv 2008;105(2):751-6.
285. Wang X, Fu S, Wang Y, Yu P, Hu J, Gu W, et al. Interleukin-1beta mediates proliferation and differentiation of multipotent neural precursor cells through the activation of SAPK/JNK pathway. *Mol Cell Neurosci*. nov 2007;36(3):343-54.
286. Green HF, Nolan YM. Unlocking mechanisms in interleukin-1 β -induced changes in hippocampal neurogenesis--a role for GSK-3 β and TLX. *Transl Psychiatry*. 2012;2:e194.
287. Butovsky O, Ziv Y, Schwartz A, Landa G, Talpalar AE, Pluchino S, et al. Microglia activated by IL-4 or IFN-gamma differentially induce neurogenesis and oligodendrogenesis from adult stem/progenitor cells. *Mol Cell Neurosci*. janv 2006;31(1):149-60.
288. Walter J, Honsek SD, Illes S, Wellen JM, Hartung H-P, Rose CR, et al. A new role for interferon gamma in neural stem/precursor cell dysregulation. *Mol Neurodegener*. 2011;6:18.
289. Walter J, Hartung H-P, Dihn  M. Interferon gamma and sonic hedgehog signaling are required to dysregulate murine neural stem/precursor cells. *PloS One*. 2012;7(8):e43338.
290. Chen E, Xu D, Lan X, Jia B, Sun L, Zheng JC, et al. A novel role of the STAT3 pathway in brain inflammation-induced human neural progenitor cell differentiation. *Curr Mol Med*. nov 2013;13(9):1474-84.
291. Zunszain PA, Anacker C, Cattaneo A, Choudhury S, Musaelyan K, Myint AM, et al. Interleukin-1 β : a new regulator of the kynurenine pathway affecting human hippocampal neurogenesis. *Neuropsychopharmacol Off Publ Am Coll Neuropsychopharmacol*. mars 2012;37(4):939-49.
292. Goshen I, Kreisel T, Ben-Menachem-Zidon O, Licht T, Weidenfeld J, Ben-Hur T, et al. Brain interleukin-1 mediates chronic stress-induced depression in mice via adrenocortical activation and hippocampal neurogenesis suppression. *Mol Psychiatry*. juill 2008;13(7):717-28.
293. Johansson S, Price J, Mado M. Effect of inflammatory cytokines on major histocompatibility complex expression and differentiation of human neural stem/progenitor cells. *Stem Cells Dayt Ohio*. sept 2008;26(9):2444-54.
294. Peng H, Whitney N, Wu Y, Tian C, Dou H, Zhou Y, et al. HIV-1-infected and/or immune-activated macrophage-secreted TNF-alpha affects human fetal cortical neural progenitor cell proliferation and differentiation. *Glia*. juin 2008;56(8):903-16.
295. Lan X, Chen Q, Wang Y, Jia B, Sun L, Zheng J, et al. TNF- α affects human cortical neural progenitor cell differentiation through the autocrine secretion of leukemia inhibitory factor. *PloS One*. 2012;7(12):e50783.
296. Monje ML, Toda H, Palmer TD. Inflammatory blockade restores adult hippocampal neurogenesis. *Science*. 5 d c 2003;302(5651):1760-5.

297. Zhang Y, Liu J, Yao S, Li F, Xin L, Lai M, et al. Nuclear factor kappa B signaling initiates early differentiation of neural stem cells. *Stem Cells Dayt Ohio. mars* 2012;30(3):510-24.
298. Belmadani A, Tran PB, Ren D, Miller RJ. Chemokines regulate the migration of neural progenitors to sites of neuroinflammation. *J Neurosci Off J Soc Neurosci.* 22 mars 2006;26(12):3182-91.
299. Mäkelä J, Koivuniemi R, Korhonen L, Lindholm D. Interferon-gamma produced by microglia and the neuropeptide PACAP have opposite effects on the viability of neural progenitor cells. *PloS One.* 2010;5(6):e11091.
300. Robertson B, Kong G, Peng Z, Bentivoglio M, Kristensson K. Interferon-gamma-responsive neuronal sites in the normal rat brain: receptor protein distribution and cell activation revealed by Fos induction. *Brain Res Bull.* 1 mai 2000;52(1):61-74.
301. Moriyama M, Fukuhara T, Britschgi M, He Y, Narasimhan R, Villeda S, et al. Complement receptor 2 is expressed in neural progenitor cells and regulates adult hippocampal neurogenesis. *J Neurosci Off J Soc Neurosci.* 16 mars 2011;31(11):3981-9.
302. Islam O, Gong X, Rose-John S, Heese K. Interleukin-6 and neural stem cells: more than gliogenesis. *Mol Biol Cell.* janv 2009;20(1):188-99.
303. Zonis S, Ljubimov VA, Mahgerefteh M, Pechnick RN, Wawrowsky K, Chesnokova V. p21Cip restrains hippocampal neurogenesis and protects neuronal progenitors from apoptosis during acute systemic inflammation. *Hippocampus.* déc 2013;23(12):1383-94.
304. Kiyota T, Ingraham KL, Swan RJ, Jacobsen MT, Andrews SJ, Ikezu T. AAV serotype 2/1-mediated gene delivery of anti-inflammatory interleukin-10 enhances neurogenesis and cognitive function in APP+PS1 mice. *Gene Ther.* juill 2012;19(7):724-33.
305. Perez-Asensio FJ, Perpiñá U, Planas AM, Pozas E. Interleukin-10 regulates progenitor differentiation and modulates neurogenesis in adult brain. *J Cell Sci.* 15 sept 2013;126(Pt 18):4208-19.
306. Rauwel B, Mariamé 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.* mars 2010;84(6):2946-54.
307. Lehmann JM, Moore LB, Smith-Oliver TA, Wilkison WO, Willson TM, Kliewer SA. An antidiabetic thiazolidinedione is a high affinity ligand for peroxisome proliferator-activated receptor gamma (PPAR gamma). *J Biol Chem.* 2 juin 1995;270(22):12953-6.
308. Heikkinen S, Auwerx J, Argmann CA. PPARgamma in human and mouse physiology. *Biochim Biophys Acta.* août 2007;1771(8):999-1013.
309. Chui PC, Guan H-P, Lehrke M, Lazar MA. PPARgamma regulates adipocyte cholesterol metabolism via oxidized LDL receptor 1. *J Clin Invest.* août 2005;115(8):2244-56.

310. Ricote M, Li AC, Willson TM, Kelly CJ, Glass CK. The peroxisome proliferator-activated receptor-gamma is a negative regulator of macrophage activation. *Nature*. 1 janv 1998;391(6662):79-82.
311. Jiang C, Ting AT, Seed B. PPAR-gamma agonists inhibit production of monocyte inflammatory cytokines. *Nature*. 1 janv 1998;391(6662):82-6.
312. Széles L, Töröcsik D, Nagy L. PPARgamma in immunity and inflammation: cell types and diseases. *Biochim Biophys Acta*. août 2007;1771(8):1014-30.
313. Szatmari I, Gogolak P, Im JS, Dezso B, Rajnavolgyi E, Nagy L. Activation of PPARgamma specifies a dendritic cell subtype capable of enhanced induction of iNKT cell expansion. *Immunity*. juill 2004;21(1):95-106.
314. Nencioni A, Grünebach F, Zobywalski A, Denzlinger C, Brugger W, Brossart P. Dendritic cell immunogenicity is regulated by peroxisome proliferator-activated receptor gamma. *J Immunol Baltim Md 1950*. 1 août 2002;169(3):1228-35.
315. Wang YL, Frauwirth KA, Rangwala SM, Lazar MA, Thompson CB. Thiazolidinedione activation of peroxisome proliferator-activated receptor gamma can enhance mitochondrial potential and promote cell survival. *J Biol Chem*. 30 août 2002;277(35):31781-8.
316. Padilla J, Kaur K, Cao HJ, Smith TJ, Phipps RP. Peroxisome proliferator activator receptor-gamma agonists and 15-deoxy-Delta(12,14)(12,14)-PGJ(2) induce apoptosis in normal and malignant B-lineage cells. *J Immunol Baltim Md 1950*. 15 déc 2000;165(12):6941-8.
317. Straus DS, Glass CK. Anti-inflammatory actions of PPAR ligands: new insights on cellular and molecular mechanisms. *Trends Immunol*. déc 2007;28(12):551-8.
318. Barak Y, Nelson MC, Ong ES, Jones YZ, Ruiz-Lozano P, Chien KR, et al. PPAR gamma is required for placental, cardiac, and adipose tissue development. *Mol Cell*. oct 1999;4(4):585-95.
319. Fournier T, Tsatsaris V, Handschuh K, Evain-Brion D. PPARs and the placenta. *Placenta*. mars 2007;28(2-3):65-76.
320. Fournier T, Guibourdenche J, Handschuh K, Tsatsaris V, Rauwel B, Davrinche C, et al. PPAR γ and human trophoblast differentiation. *J Reprod Immunol*. juin 2011;90(1):41-9.
321. Fournier T, Handschuh K, Tsatsaris V, Evain-Brion D. Involvement of PPARgamma in human trophoblast invasion. *Placenta*. avr 2007;28 Suppl A:S76-81.
322. Schaiff WT, Barak Y, Sadovsky Y. The pleiotropic function of PPAR gamma in the placenta. *Mol Cell Endocrinol*. 25 avr 2006;249(1-2):10-5.
323. Jawerbaum A, Capobianco E. Review: Effects of PPAR activation in the placenta and the fetus: implications in maternal diabetes. *Placenta*. mars 2011;32 Suppl 2:S212-217.

324. McCarthy FP, Drewlo S, English FA, Kingdom J, Johns EJ, Kenny LC, et al. Evidence implicating peroxisome proliferator-activated receptor- γ in the pathogenesis of preeclampsia. *Hypertension*. nov 2011;58(5):882-7.
325. Díaz M, Bassols J, López-Bermejo A, Gómez-Roig MD, de Zegher F, Ibáñez L. Placental expression of peroxisome proliferator-activated receptor γ (PPAR γ): relation to placental and fetal growth. *J Clin Endocrinol Metab*. août 2012;97(8):E1468-1472.
326. Kadam L, Kohan-Ghadr HR, Drewlo S. The balancing act – PPAR- γ 's roles at the maternal-fetal interface. *Syst Biol Reprod Med*. 4 mars 2015;61(2):65-71.
327. Cimini A, Cerù MP. Emerging roles of peroxisome proliferator-activated receptors (PPARs) in the regulation of neural stem cells proliferation and differentiation. *Stem Cell Rev*. déc 2008;4(4):293-303.
328. 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. *J Biol Chem*. 5 mai 2006;281(18):12673-81.
329. Wada K, Kamisaki Y. [Role of PPARgamma in the development of the central nervous system]. *Nihon Yakurigaku Zasshi Folia Pharmacol Jpn*. oct 2003;122(4):301-8.
330. Stergiopoulos A, Politis PK. The role of nuclear receptors in controlling the fine balance between proliferation and differentiation of neural stem cells. *Arch Biochem Biophys*. juin 2013;534(1-2):27-37.
331. van Neerven S, Kampmann E, Mey J. RAR/RXR and PPAR/RXR signaling in neurological and psychiatric diseases. *Prog Neurobiol*. août 2008;85(4):433-51.
332. Kersten S, Desvergne B, Wahli W. Roles of PPARs in health and disease. *Nature*. 25 mai 2000;405(6785):421-4.
333. Ghoochani A, Shabani K, Peymani M, Ghaedi K, Karamali F, Karbalaei K, et al. The influence of peroxisome proliferator-activated receptor γ (1) during differentiation of mouse embryonic stem cells to neural cells. *Differ Res Biol Divers*. janv 2012;83(1):60-7.
334. Goebue T, Van Meensel B, Beuselinck K, Cossey V, Van Ranst M, Hanssens M, et al. Clinical predictive value of real-time PCR quantification of human cytomegalovirus DNA in amniotic fluid samples. *J Clin Microbiol*. mars 2009;47(3):660-5.
335. Duan SZ, Usher MG, Mortensen RM. Peroxisome proliferator-activated receptor-gamma-mediated effects in the vasculature. *Circ Res*. 15 févr 2008;102(3):283-94.
336. Gaytant MA, Steegers EAP, Semmekrot BA, Merkus HMMW, Galama JMD. Congenital cytomegalovirus infection: review of the epidemiology and outcome. *Obstet Gynecol Surv*. avr 2002;57(4):245-56.

337. Mutnal MB, Hu S, Little MR, Lokensgard JR. Memory T cells persisting in the brain following MCMV infection induce long-term microglial activation via interferon- γ . *J Neurovirol.* oct 2011;17(5):424-37.
338. Sakao-Suzuki M, Kawasaki H, Akamatsu T, Meguro S, Miyajima H, Iwashita T, et al. Aberrant fetal macrophage/microglial reactions to cytomegalovirus infection. *Ann Clin Transl Neurol.* août 2014;1(8):570-88.
339. Zhang W-J, Peng C-H, Zheng S-S. Programmed death 1 and programmed death ligand 1 expressions in patients with chronic hepatitis B. *Hepatobiliary Pancreat Dis Int HBPDI.* août 2013;12(4):394-9.
340. Hassan SS, Akram M, King EC, Dockrell HM, Cliff JM. PD-1, PD-L1 and PD-L2 Gene Expression on T-Cells and Natural Killer Cells Declines in Conjunction with a Reduction in PD-1 Protein during the Intensive Phase of Tuberculosis Treatment. *PLoS One.* 2015;10(9):e0137646.
341. Hatano H, Jain V, Hunt PW, Lee T-H, Sinclair E, Do TD, et al. Cell-based measures of viral persistence are associated with immune activation and programmed cell death protein 1 (PD-1)-expressing CD4+ T cells. *J Infect Dis.* juill 2013;208(1):50-6.
342. Keir ME, Butte MJ, Freeman GJ, Sharpe AH. PD-1 and its ligands in tolerance and immunity. *Annu Rev Immunol.* 2008;26:677-704.
343. Lazzarotto T, Varani S, Guerra B, Nicolosi A, Lanari M, Landini MP. Prenatal indicators of congenital cytomegalovirus infection. *J Pediatr.* juill 2000;137(1):90-5.
344. Picone O, Vauloup-Fellous C, Cordier A-G, Parent Du Châtelet I, Senat M-V, Frydman R, et al. A 2-year study on cytomegalovirus infection during pregnancy in a French hospital. *BJOG Int J Obstet Gynaecol.* mai 2009;116(6):818-23.
345. Vauloup-Fellous C, Picone O, Cordier A-G, Parent-du-Châtelet I, Senat M-V, Frydman R, et al. Does hygiene counseling have an impact on the rate of CMV primary infection during pregnancy? Results of a 3-year prospective study in a French hospital. *J Clin Virol Off Publ Pan Am Soc Clin Virol.* déc 2009;46 Suppl 4:S49-53.
346. Lagrou K, Bodeus M, Van Ranst M, Goubau P. Evaluation of the new architect cytomegalovirus immunoglobulin M (IgM), IgG, and IgG avidity assays. *J Clin Microbiol.* juin 2009;47(6):1695-9.
347. Lumley S, Patel M, Griffiths PD. The combination of specific IgM antibodies and IgG antibodies of low avidity does not always indicate primary infection with cytomegalovirus. *J Med Virol.* mai 2014;86(5):834-7.
348. Lazzarotto T, Guerra B, Lanari M, Gabrielli L, Landini MP. New advances in the diagnosis of congenital cytomegalovirus infection. *J Clin Virol Off Publ Pan Am Soc Clin Virol.* mars 2008;41(3):192-7.
349. Preiksaitis JK, Hayden RT, Tong Y, Pang XL, Fryer JF, Heath AB, et al. Are We There Yet? Impact of the First International Standard for Cytomegalovirus DNA on the

Harmonization of Results Reported on Plasma Samples. *Clin Infect Dis Off Publ Infect Dis Soc Am.* 15 juin 2016;

350. Desveaux C, Klein J, Leruez-Ville M, Ramirez-Torres A, Lacroix C, Breuil B, et al. Identification of Symptomatic Fetuses Infected with Cytomegalovirus Using Amniotic Fluid Peptide Biomarkers. *PLoS Pathog.* janv 2016;12(1):e1005395.
351. Mueller SN, Ahmed R. High antigen levels are the cause of T cell exhaustion during chronic viral infection. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 26 mai 2009;106(21):8623-8.
352. Odeberg J, Wolmer N, Falci S, Westgren M, Seiger A, Söderberg-Nauclér C. Human cytomegalovirus inhibits neuronal differentiation and induces apoptosis in human neural precursor cells. *J Virol.* sept 2006;80(18):8929-39.

Déterminants immuno-virologiques de l'infection congénitale à cytomégalovirus dans les prélèvements fœtaux périphériques et dans le tissu cérébral

Résumé : Avec une prévalence mondiale de 0,7%, l'infection *in utero* à cytomégalovirus (CMV) représente la première cause de handicap neurologique congénital d'origine infectieuse. Les modalités de prise en charge de cette infection restent débattues notamment en raison de l'absence de marqueurs pronostics fiables et d'inconnus sur sa physiopathologie notamment celle de l'atteinte du cerveau fœtal. Le premier objectif de notre travail était de décrire et valider des marqueurs immuno-virologiques prédictifs de la transmission verticale et de séquelles néonatales. Le deuxième objectif était d'étudier les corrélats immuno-virologiques *in situ* de la sévérité de l'atteinte du cerveau fœtal. Nous avons pu établir à partir du bilan virologique maternel (avidité des IgG et ADN CMV sanguin) un score de risque de transmission verticale du virus en cas de primo-infection maternelle. Nous avons montré que le niveau du réservoir viral fœtal, reflété par la charge virale dans le liquide amniotique et dans le sang fœtal, était un marqueur prédictif des séquelles néonatales. Ainsi, la combinaison de la mesure du réservoir viral fœtal avec l'imagerie fœtale a permis d'établir des scores pronostics avec des valeurs prédictives positives et négatives de 80 à 100% respectivement. Nous avons mis en évidence par immuno-histochimie couplée à une analyse quantitative d'images que la multiplication virale ainsi que la réponse immunitaire innée (cellules NK) et adaptative (CD8+ et plasmocytes) étaient significativement plus élevées dans les cerveaux fœtaux les plus sévèrement atteints. Ce résultat paradoxal nous a incité à quantifier la présence du marqueur PD-1 et celle de son récepteur PD-L1. PD-1 était significativement plus exprimé dans les cerveaux sévèrement atteints. L'analyse par cytométrie de flux montrait que PD-1 était exprimé par 96% des CD8+ mais aussi par plus de 70% des lymphocytes B et des cellules NK. Ces résultats témoignent de l'existence dans les cerveaux fœtaux infectés d'un épuisement immunitaire touchant la réponse adaptative mais aussi innée. Enfin, l'analyse par cytométrie de flux montrait la présence d'une réplication virale dans les différents types de cellules neuronales (cellules souches, neurones, astrocytes). En conclusion, les résultats de notre travail ont permis d'améliorer les algorithmes de prise en charge de l'infection à CMV *in utero* grâce à la validation de marqueurs prédictifs immuno-virologiques. Par ailleurs, le fait qu'un épuisement immunitaire et une forte multiplication virale soient associés à la sévérité de l'atteinte cérébrale est important pour l'élaboration de stratégies thérapeutiques *in utero*.

Immuno-virologic determinants of congenital cytomegalovirus infection in peripheral fetal samples and brain tissue

Abstract: CMV congenital infection has a worldwide incidence estimated at about 0.7% of all life births and represents the major cause of neurological handicap of infectious origin. The management of this infection remains highly debated. Several factors contribute to this and among them are the absence of recognized prognostic markers and gaps in the knowledge of its pathogenicity particularly that of the fetal brain. The first objective of this work was to describe and validate immune and virological predictive markers of vertical transmission and of neonatal sequelae. The second objective was to study *in situ* immune and virological correlates of the severity of fetal brain infection. We first validated a model of materno-fetal transmission based on maternal virological results (IgG avidity and blood CMV DNA). We then showed that the viral reservoir level, estimated by the viral load in the amniotic fluid and the fetal blood, was a predictive marker of neonatal sequelae. Prognosis models combining quantification of the viral reservoir to fetal imaging allow to reach positive and negative predictive values up to 80% and 100% respectively. We showed using immunohistochemistry and quantitative image analysis that viral multiplication as well as both innate immune responses (NK cells) and adaptive immune responses (CD8+ and plasma cells) were significantly higher in the most severely infected fetal brains. This paradox drove us to quantify PD-1 and its receptor PD-L1, PD-1 expression was significantly higher in severely affected fetal brains. Cytometry flow analysis evidenced that PD-1 was expressed in 95% of CD8+ cells but also in at least 70% of NK cells and of B cells. These results demonstrate immune exhaustion of both adaptive and innate responses in fetal infected brains. Finally, viral replication was evidenced in stem cells, neurons and mature astrocytes after separation by flow cytometry of these neuronal cell types. In conclusion, the validation of immune-virological markers obtained within this work has usefully improved the algorithms for the clinical management of *in utero* CMV infection. Moreover, the demonstration that immune exhaustion and high viral multiplication are responsible of severe fetal brain affection is important to elaborate *in utero* treatment strategies.

Mots clés : Cytomégalovirus, infection congénitale, fœtus, cerveau, réponse immunitaire, valeurs pronostiques

Keywords : Cytomegalovirus, congenital infection, fetus, brain, immune response, prognosis values