

UNIVERSITE DE LIMOGES

ECOLE DOCTORALE n°524 Biologie et Santé

FACULTE de Médecine

Unité mixte de recherche INSERM 1092 Anti-infectieux : supports moléculaires des résistances et innovations thérapeutiques

Thèse N° [-----]

Thèse

pour obtenir le grade de

DOCTEUR DE L'UNIVERSITÉ DE LIMOGES

Spécialité : Immunologie, oncologie et infectiologie

présentée et soutenue par

Déborah Andouard

le 18 décembre 2015

**Impact de molécules antivirales sur la réplication du
cytomégalovirus humain dans des modèles cellulaires et
placentaires.**

Thèse dirigée par Mme le Professeur Sophie ALAIN

Et codirigée par Mr le Docteur Sébastien Hantz

JURY :

Mme le Docteur Marie-Christine Mazon	Rapporteur
Mme le Docteur Natacha Teissier	Rapporteur
Mr le Professeur Yves Aubard	Examineur
Mr le Professeur François Denis	Invité
Mr le Docteur Sébastien Hantz	Invité
Mme le Professeur Sophie Alain	Directeur de thèse

Remerciements

A Madame le Docteur Marie-Christine Mazon, que je remercie d'avoir accepté de juger ce travail de thèse en tant que rapporteur.

A Madame le Docteur Natacha Teissier, que je remercie d'avoir accepté d'être rapporteur de ce travail de thèse.

A Monsieur le Professeur Yves Aubard, que je remercie d'avoir accepté d'examiner ce travail de thèse et de participer au jury.

A Monsieur le Professeur François Denis, pour avoir accepté de présider ce jury de thèse.

A Monsieur le Docteur Sébastien Hantz, qui m'a déjà encadré lors de mon stage de master 2 et qui a été un parfait co-directeur de thèse. Merci pour ta confiance, ta disponibilité, ton écoute et tes nombreux conseils concernant mon travail au long de ces presque quatre années passées au laboratoire.

A Madame le Professeur Sophie Alain que je remercie de cette formidable opportunité qu'a été cette thèse. Merci de m'avoir dirigée avec beaucoup d'enthousiasme pendant ces trois ans et merci infiniment de m'avoir fait confiance et laissé travailler en toute autonomie sur mes projets.

A Madame le Professeur Marie-Cécile Ploy, que je remercie pour m'avoir donné l'opportunité de réaliser mon stage de master 2 au sein de son laboratoire.

A Monsieur le Professeur William Rawlinson que je remercie de m'avoir accueilli chaleureusement au sein de son laboratoire pendant mon séjour de mobilité.

A Monsieur le Docteur Stuart Hamilton pour m'avoir suivi tout au long de mon travail au laboratoire du Pr Rawlinson. Merci pour ton aide sur les sujets que je ne maîtrisais pas et tes nombreuses idées.

C'est ainsi que s'achève la grande aventure qu'a été ma thèse. Vous êtes nombreux à m'avoir accompagné, supporté, encouragé, au long de ces trois années, il est temps pour moi de vous remercier.

Je tiens à remercier les membres de l'UMR1092, que ce soient les chefs, les post-docs, les étudiants. Plus particulièrement et tout d'abord, un grand merci aux « anciens » qui étaient là lors de mon stage de master 2 et qui m'ont accompagné pendant un bout de ma thèse. Merci à Thibault pour ta bonne humeur, Emilie pour ton soutien et les soirées enquêtes, Anthony pour toutes ces pauses canettes et nos discussions plus ou moins reliées à la thèse, et ce, en toute amitié !

Un immense merci à Sophie R pour ta joie communicative et tes encouragements, ainsi qu'à Martine, qui est un peu notre maman à tous. Je remercie également Mélissa (Mille mercis pour tes gentils mails durant mes aventures à l'autre bout du monde.), Margaux, avec qui j'ai grand hâte de tout plaquer pour élever une chèvre. Merci également à Rémi et Damien (comment ça tu ne fais pas partie de l'UMR ? :) pour nos soirées JDR, à Elo chez qui j'ai passé de chouettes soirées (encore navrée pour le poney), Florence qui amène tant de bonne humeur et de paillettes licornesques parmi nous! Merci également à Célin pour nos petites discussions tardives. Merci à Claire, qui en plus de faire du bon café n'a pas hésité à se lancer dans l'aventure du plaid. :)

Merci à mon technicien de vif Benjamin, d'avoir tout fait pour me sortir les idées de la thèse, merci pour les soirées, pour ton écoute. Promis juré, notre amitié perdurera !

Merci à toi Yohann, même si nos débuts ont été plutôt timides, je suis très contente d'avoir eu des moments en tête à tête avec toi et de te connaître un peu mieux. Vivement notre piscine sur la terrasse !

Mes remerciements ne seraient pas complets sans un merci au meilleur des co-bureaux, Gaëtan, manitou des BAC, du bon goût et du Letermovir, merci pour ces after au labo, merci d'avoir écouté mes jérémiades, merci de ta confiance, je suis contente de pouvoir rester au labo pour te soutenir à mon tour !

Ma chère jumelle de thèse Murielle, merci de m'avoir soutenue sur ce long chemin de croix qu'aura été ma thèse. Même si nous ne soutenons pas au même moment, je te promets que toi aussi tu y arriveras, tu seras d'autant plus méritante et ce jour-là, je compte bien qu'on boive beaucoup ! Surtout n'oublie pas, nous sommes des arbres et le vent souffle entre nos feuilles !

A l'autre bout du monde, une pensée pour Daniel, Pauline et Sophie, merci pour tous ces agréables week-ends, ces soirées rocambolesques à chercher des bars perdus et les fous rires. Vous avez su rendre mon séjour australien unique. Surtout à toi Sophie, je n'oublierais jamais notre goûter sur la plage qui s'est fini en instant confession au MacDo de Coogee.

Merci aux membres du co-bureau virtuel, vos encouragements, vos conseils, vos mots de soutien ont été très précieux sur la fin de ma thèse ! Merci également à George et Bayer sans qui j'aurais eu du mal à rester éveillée. :)

Un grand merci à ma famille, plus particulièrement à mon grand-père et à Tatou. Merci pour votre tendresse, votre amour, merci pour avoir cru en moi. J'éprouve une grande fierté d'être de votre famille. Je vous aime fort.

Je tiens également à remercier du fond du cœur mes amis d'Alsace et d'ailleurs. Merci à Maud, mon calamitiseur préféré, à Maddy, à ma Moman Sylvain, à David (ta cuisine me manque ! Et le cuisinier aussi), à Loïc ! Merci également à tous les Limougeauds pour ces chouettes soirées placées sous le signe de l'improbable !

Ganou, tu ne sauras peut-être jamais l'importance que tu as eue, mais merci pour tout ce que tu m'as apporté. Je pense souvent à toi.

Sol, je tenais aussi à te remercier. Ce souvenir d'une stase d'été restera gravé à jamais dans ma mémoire. Tu as changé beaucoup de choses dans ma vie, tu as su la rendre plus belle encore. Je t'aime.

Ma très chère Camille, je suis heureuse que notre amitié reste inchangée malgré les années (14 ans déjà !) et les distances (mais quelle idée avons-nous d'aller aux antipodes du monde ?). Je suis très fière de voir ce que tu as réussi à accomplir, et j'espère de tout cœur que nous continuerons à entretenir une si belle relation. Tu sais, même si j'ai du mal à le dire, je t'aime aussi.

Amaël, je n'aurais jamais pu rêver d'un meilleur soutien que le tien. Toi qui tu as su me faire monter dans le bon train, tu as été d'une patience incroyable face à mes nombreux doutes. Pour ta tendresse, ta douceur, tout ce bonheur que tu m'apportes, merci. J'espère que nous continuerons à progresser ensemble dans les prochaines années et que nous vivrons de grandes et belles aventures à deux. Je t'aime jusqu'au ciel.

Isn't it a noble, an enlightened way of spending our brief time in the sun, to work at understanding the universe and how we have come to wake up in it?

Richard Dawkins

A mes grands-parents, à Amaël

Sommaire

Liste des figures	5
Liste des abréviations	8
Introduction	11
Chapitre 1: Le placenta humain	14
1. Morphologie du placenta humain.....	15
2. Genèse et développement du placenta	17
3. La grossesse, un paradoxe immunitaire	21
4. Infection par les pathogènes microbiens à la surface materno-foetale.....	25
Chapitre 2: Infection congénitale à CMVH.....	31
1. Structure et génome du CMVH.....	32
2. Physiopathologie de l'infection à CMVH.....	36
3. Transmission du virus	47
4. Epidémiologie de l'infection congénitale.....	48
5. Mécanisme de l'infection du placenta par le CMVH	52
6. Réponse immunitaire maternelle à l'infection à CMVH.....	59
7. Modèles d'études de l'infection congénitale à CMVH.....	70
Chapitre 3: Prise en charge et traitements du CMVH.....	76
1. Prévention de l'infection congénitale à CMVH.....	77
2. Traitements et inhibiteurs du CMVH.....	78
3. Immunisation passive: les immunoglobulines.....	93
4. Vaccins	95
Chapitre 4: Etude expérimentale	98
Objectif de l'étude expérimentale	98
Résultats.....	100
Etude de l'effet de molécules inhibitrices de l'infection à CMVH <i>in vitro</i>	101
1. Introduction	101
2. Article: New cyclooxygenase II inhibitors and their impact on HCMV infection <i>in vitro</i>	102
3. Conclusion	119
Modèle ex-vivo de l'infection placentaire durant le premier trimestre. .	121
1. Objectifs	121
2. Résultats	122
Conclusion et perspectives	160
Bibliographie	164
Annexes	176

1. Milieux pour la culture de cellules/explants placentaires	176
2. Amorces utilisées pour la quantification des ARN messagers	176
Communications orales et posters	177
Travaux complémentaires	178

Liste des figures

Figure n° 1: Schéma représentant la structure du placenta à terme.....	p16
Figure n°2: Développement du placenta.....	p17
Figure n°3 : Evolution de la concentration dans le sérum de cytokines et facteurs de croissance au long des trois trimestres de grossesse.....	p20
Figure n°4 : Régulation du développement placentaire et de la tolérance materno-fœtale via les chimiokines.....	p22
Figure n°5 : Schéma représentant les différentes interfaces materno-fœtales placentaires.....	p23
Figure n°6 : Tableau résumant les différents pathogènes capables de traverser la barrière placentaire.....	p24
Figure n°7: Tableau récapitulatif des sous-familles des herpès virus.....	p32
Figure n°8 : Schéma représentant la structure de la capsid virale du CMVH.....	p33
Figure n°9 : Génome simplifié du CMVH et représentation des quatre isomères possibles.....	p35
Figure n°10: «Oeil de hibou» formé par les corps d'inclusion et foyer de cellules ballonnées observé en microscopie.....	p36
Figure n°11: Illustration du mécanisme d'entrée du CMVH dans les cellules.....	p38
Figure n°12: Schéma simplifié du cycle de réplication virale du CMVH.....	p39
Figure n° 13: Contrôle immunitaire du CMVH par l'immunité innée et adaptative.....	p45
Figure n°14: Séroprévalence du CMVH chez les femmes en âge de procréer et prévalence de l'infection congénitale à CMVH	p49
Figure n°15: Schéma détaillant les risques de développement d'un CMVH congénital, selon la prévalence de l'infection à CMV chez les jeunes femmes.....	p50
Figure n°16: représentation schématique des modèles d'infection du CMVH à la surface materno-fœtale	p53

Figure n°17: Schéma de la transmission du CMV dans les villosités chorioniques flottantes.....	p56
Figure n°18: Représentation schématique des voies du CMV au fœtus et les réponses immunitaires potentiellement importantes dans la transmission et la prévention de l'infection virale.....	p60
Figure n°19: Tableau résumant les effecteurs de l'immunité innée et leur rôle présumé dans le contrôle ou la susceptibilité face à l'infection congénitale à CMVH.....	p61
Figure n°20: Tableau résumant les effecteurs de l'immunité acquise dans les compartiments materno-fœtaux, et leur rôle présumé dans le contrôle ou la susceptibilité face à l'infection congénitale à CMVH.....	p64
Figure n°21: Schéma récapitulatif la force des réponses CD4+ et CD8+ dirigée contre les différentes protéines virales	p66
Figure n°22: schéma représentant la proportion de réponse CD4+ et CD8+ selon les protéines virales.....	p67
Figure n°23: Comparaison entre le placenta murin et le placenta humain.....	p73
Figure n°24: Carte des résistances aux inhibiteurs de la polymérase virale pUL54.....	p79
Figure n°25 : Structure chimique des inhibiteurs de la polymérase virale UL54....	p80
Figure n°26 : Structure chimique du maribavir.....	p83
Figure n°27: Structure chimique du BDCRB et du TCRB.....	p84
Figure n°28: Structure chimique du toméglovir.....	p85
Figure n°29: Structure chimique du letermovir.....	p86
Figure n°30: Structure chimique de l'aspirine et de l'indométacine.....	p87
Figure n°31: Structure chimique de l'artésunate.....	p88
Figure n°32: Structure chimique de divers flavonoïdes.....	p89
Figure n°33 : Structure chimique d'inhibiteurs des cdk.....	p90

Figure n°34 : Structure chimique de l'everolimus et du sirolimus.....	p92
Figure n°35 : Structure chimique du léflunomide.....	p93
Figure n°36 : Tableau résumant des vaccins en cours de développement/essai clinique	p96
Figure n° 37 : Impact des antiviraux sur l'infection à CMVH dans les MRC-5.....	p137
Figure n° 38 : Impact des antiviraux sur l'infection à CMVH dans les HFFs.....	p138
Figure n° 39 : Impact des antiviraux sur l'expression des protéines virales IEA et pp65 dans les TEV-1 à J4, J7 et J10.....	p140-141
Figure n° 40 : Impact des antiviraux dans les explants de premier trimestre à J4, J7, J10 et J13.....	p142-143
Figure n° 41 : Graphiques représentant l'impact des antiviraux dans les explants placentaires de 3ème trimestre à J4, J7, J10 et J13.....	p145-146
Figure n° 42 : Profil d'expression des ratios d'ARNm des cytokines pro-inflammatoires dans les explants placentaires de premier et troisième trimestre de grossesse.....	p148-149
Figure n° 43 : Impact des antiviraux sur les ratios d'expression des ARNm de MCP-1 à J4, J7, J10 et J13.....	p150-151
Figure n° 44 : Impact des antiviraux sur les ratios d'expression des ARNm de IP-10 à J4, J7, J10 et J13.....	p152
Figure n°45 : Impact des antiviraux sur les ratios d'expression des ARNm de TNF- α à J4, J7, J10 et J13.....	p153-154
Figure n° 46 : Impact de l'artésunate (ART) et du ganciclovir (GCV) sur l'expression des ARNm des cytokines pro-inflammatoires à J4, J7, J10, J13.....	p155-156

Liste des abréviations

ADN: Acide désoxyribonucléique

AINS: Anti-inflammatoire non stéroïdien

ARN: Acide ribonucléique

ARNm: ARN messenger

BAC: Bacterial Artificial Chromosome ou chromosome artificiel bactérien

Cdk: *cyclin dependant kinase*

CMVH: Cytomégalovirus humain

COX: cyclooxygénase

CSF: *colony stimulating factor*

gB/gH/gM/gN: Glycoprotéine B/H/M/N

GCV: Ganciclovir

GM-CSF: *Granulocyte-macrophage colony stimulating factor*

GPCMV: Guinea pig cytomegalovirus (cochon d'inde)

B-HCG: Hormone gonadotrophique chorionique

HFF: *Human foreskin fibroblast*

HLA: *Human leukocyte antigen* ou antigène des leucocytes humains

HUVEC: *Human umbilical vein endothelial cell*

HSV: Herpes simplex virus ou virus herpès simplex

IDO: Indoléamine 2.3 dioxygénase

IE: *Immediate early* ou très précoce

IFN: Interféron

Ig: Immunoglobuline

IL: Interleukine

MBV: Maribavir

mCP: *Minor capsid protein* ou protéine mineure de capside

MCP: *Major capsid protein* ou protéine majeure de capside

MCP-1: *Monocyte chemoattractant protein 1 (CCL2)*

NK: *Natural killer*

PGE2: Prostaglandine 2

PFA: Foscarnet

RANTES: *Regulated on Activation, Normal T Cell Expressed and Secreted (CCL5)*

Rb: Rétinoblastome

RhCMV: CMV de macaque rhésus

SCP: *Smallest capsid protein* ou petite protéine de capside

SIDA: Syndrome d'immunodéficience acquise

SVF: Serum de Veau Foetal

TEV-1: *First-trimester extravillous trophoblast cell line*

TLR: Toll-like receptor

TNF: *Tumor necrosis factor* ou facteur de nécrose tumorale

TRL: Séquences répétées terminales de la région longue

TRS: Séquences répétées terminales de la région courte

UL: Segment unique long (*unique long*)

US: Segment unique short (*unique court*)

utMVEC: *Uterine Microvascular Endothelial Cells*

μM: Micromolaire

VIH: Virus de l'immunodéficience humaine

VZV: Virus de la varicelle et du zona

Introduction

Le cytomégalovirus humain (CMVH) est un virus ubiquitaire dont la séroprévalence au niveau mondial varie entre 50 et 90% selon le contexte socio-économique. Ce virus, persistant à l'état latent chez les sujets immunocompétents, est responsable de pathologies potentiellement graves chez les sujets immunodéprimés tels les personnes infectées par le VIH au stade SIDA et les transplantés. Ce virus est aussi la première cause d'infection virale congénitale, le risque étant plus important dans le cadre d'une primo-infection chez la femme enceinte et variant avec le stade de la grossesse. Du fait de ses interactions avec le métabolisme cellulaire, le rôle du CMVH dans la genèse de tumeurs cérébrales a également été suggéré (Lucas et al., 2011).

Il existe à ce jour peu de traitements contre le CMVH, et tous les traitements disponibles en routine sont virostatiques, ciblant l'ADN polymérase virale pUL54. De plus, leur administration prolongée chez les personnes immunodéprimées favorise l'émergence de résistances. Par ailleurs, leurs effets secondaires hématologiques ou rénaux, contre-indiquent leur administration chez la femme enceinte. La nécessité de traitements pour prévenir les conséquences de l'infection congénitale et pour traiter les patients immunodéprimés en cas de résistance font de la recherche de nouvelles thérapeutiques anti-CMVH une priorité.

Dans le cadre de ce travail de thèse nous nous sommes intéressés à l'utilisation d'inhibiteurs de la cyclooxygénase-2 (COX-2), dérivés de molécules flavonoïdiques. En effet, le CMVH est retrouvé dans certaines tumeurs (Lucas et al.,

2011) et la capacité du virus à moduler certaines voies oncogènes (Barami, 2010) (Cinatl et al., 2004) lui permet d'augmenter sa propre réplication. L'inhibition de l'une de ces voies, induite par l'enzyme COX-2 réduit l'infection virale *in vitro* (Speir et al., 1998),(Zhu et al., 2002). Nous avons donc testé différents composés inhibant cette voie, en testant tout d'abord leur toxicité, avant de déterminer leur efficacité sur diverses souches de CMVH, et les avons associés avec d'autres inhibiteurs du CMVH afin de trouver des combinaisons synergiques permettant de réduire les doses de composés utilisés.

De nombreuses cellules peuvent être infectées par le CMVH *in vivo* mais très peu sont permissives pour la réplication virale *in vitro*. Par ailleurs, l'étroite spécificité d'espèce du CMVH limite l'utilisation des modèles animaux. Le développement de modèles de culture de tissus est donc très utile pour l'étude de la réplication virale et de son inhibition. Dans une deuxième partie de ce travail de thèse, nous nous sommes intéressés à l'infection congénitale à CMVH et à l'utilisation d'un modèle *ex-vivo* afin de mieux comprendre les mécanismes impliqués lors de l'infection placentaire et de tester des thérapeutiques anti-CMVH. Nous avons ainsi développé et amélioré un modèle *ex-vivo* de placenta de premier trimestre au sein du laboratoire UMR 1092.

L'immunité maternelle joue un rôle important dans le maintien d'une grossesse viable, et les changements des profils Th1/Th2 au cours des différents trimestres sont un point essentiel à ce maintien. Le CMVH dérégule cette balance, et ces altérations dans la production de cytokines peuvent être impliquées dans les dommages au fœtus (Kovács et al., 2007). Afin de mieux comprendre l'impact du

CMVH dans les changements de profils cytokiniques, nous avons effectué un premier travail de comparaison entre premier et troisième trimestre de grossesse via le modèle *ex vivo*. Nous avons voulu également tester l'impact de différents antiviraux sur l'expression de ces cytokines pro-inflammatoires, afin de déterminer leur potentiel sur l'expression des cytokines dans des placentas infectés par le CMVH.

Chapitre 1: Le placenta humain

Chez les mammifères vivipares, le placenta joue un rôle clé dans le maintien de la grossesse et le développement fœtal. Le placenta humain est hémochorial, ce qui implique un contact direct entre sang maternel et les syncytiotrophoblastes recouvrant les villosités, ainsi qu'avec les cytotrophoblastes présents dans les vaisseaux utérins. Il est un lieu d'échange permanent entre la mère et l'enfant, et permet le transport de l'oxygène et des nutriments de la mère au fœtus, et le transport du CO₂ et des déchets depuis le fœtus à la mère (Donnelly and Campling, 2014).

1. Morphologie du placenta humain

Le placenta est un organe discoïde possédant deux surfaces bien distinctes; du côté fœtal se trouve la plaque chorionique où est attaché le cordon ombilical et du côté maternel la plaque basale avec l'endomètre maternel. Les villosités terminales représentent le site le plus important pour les échanges materno-fœtaux, et flottent directement dans le sang maternel. Les artères utérines passent près de l'endomètre et de la plaque basale.

Jusqu'à la vingtième semaine de grossesse, les villosités placentaires sont constituées de quatre couches cellulaires : la surface externe des villosités côté maternel est constituée de syncytiotrophoblastes, générés par la fusion de cytotrophoblastes, ensuite se trouve une couche composée de cytotrophoblastes entourant le mésenchyme, et enfin une couche endothéliale entourant les capillaires fœtaux.(Gude et al., 2004)

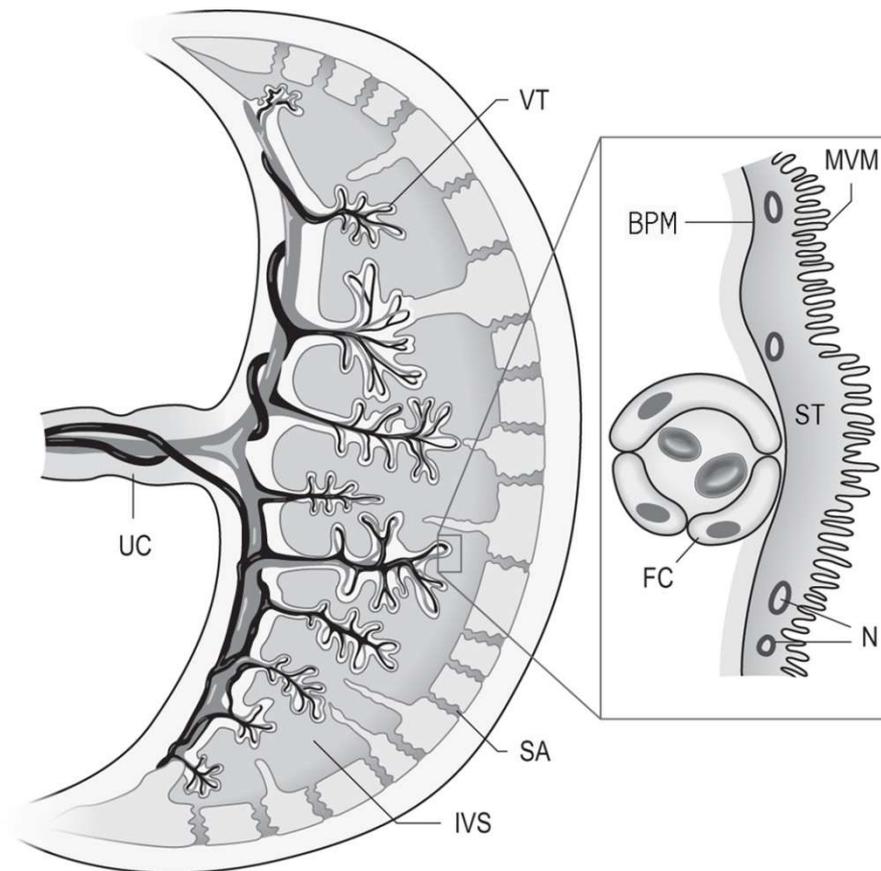


Figure n° 1 Schéma représentant la structure du placenta à terme. Sont représentés l'espace intervilloux (IVS), l'artère spiralée (SA), le cordon ombilical (UC) et les villosités (VT) L'encadré montre en détail la structure des villosités placentaires, comprenant les syncytiotrophoblastes (ST), les noyaux des syncytiotrophoblastes (N), les microvillosités (MVM), la membrane basale (BPM) et les cellules endothéliales du capillaire fœtal (FC).D'après (Gaccioli et al., 2013)

Les cytotrophoblastes disparaissent au cours du second trimestre de grossesse, ce qui a pour effet de rapprocher les capillaires fœtaux du sang maternel avec seulement les syncytiotrophoblastes pour les séparer. Entre le cœur stromal et les cellules du mésenchyme se trouvent des macrophages appelés cellules de Hofbauer (Maidji et al., 2002).

2. Genèse et développement du placenta

Le placenta est un organe hyperspécialisé issu du blastocyste. Son développement et son maintien dépendent d'un profil d'expression de cytokines particulier. Nous verrons ici les différentes étapes de son développement et les différents effecteurs cytokiniques entrant en jeu tout au long de la grossesse.

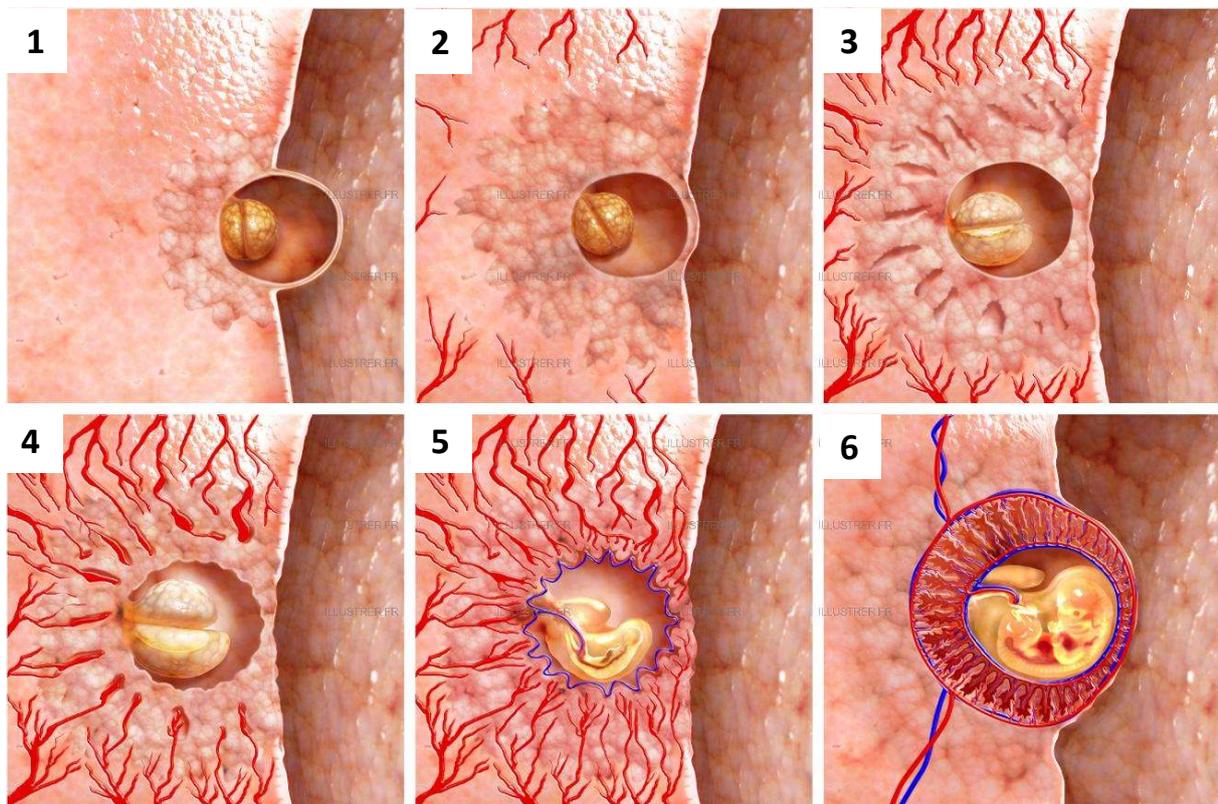


Figure n°2: Développement du placenta. 1. Implantation du blastocyste dans l'endomètre utérin. 2. Développement de la circulation sanguine et extension du trophoblaste. 3. Formation des cavités dans l'endomètre. 4. Le sang maternel remplit les lacunes. 5. Mise en place de la circulation sanguine fœtale et des ébauches de villosités. 6. Les villosités chorioniques et la circulation sanguine sont mises en place. 6. Le placenta est achevé. Source: <http://www.comparlimage.com/illustrations/medicales/>

2.1 Premier trimestre de grossesse

Une fois fécondé, le blastocyste va migrer dans l'utérus et s'orienter. Les cellules du trophoctoderme vont sécréter des protéases qui vont lyser la pellicule entourant le blastocyste. Une fois celui-ci adhérent à la paroi utérine, les cellules du trophoctoderme vont s'immiscer entre les cellules épithéliales de l'endomètre et vont fusionner en syncytiotrophoblastes qui vont se multiplier et envahir la matrice de l'endomètre maternel. La seconde couche, constituée de cytotrophoblastes va migrer dans l'endomètre ainsi que le cœur stromal (Bischof and Campana, 1996). L'activité lytique des syncytiotrophoblastes permet la digestion des parois des capillaires de l'endomètre. Le sang maternel va emplir les lacunes et des premières ébauches de villosités se mettent en place.

Lors de la placentation, les cytotrophoblastes se différencient dans la population de trophoblastes dans les villosités d'ancrage et flottantes. Les cytotrophoblastes présents dans les villosités flottantes fusionnent en syncytiotrophoblastes multi nucléaires, vont couvrir la surface des villosités, seront en contact direct avec le sang maternel, et apporteront les substances du sang maternel au fœtus à travers le placenta. Les cytotrophoblastes présents dans les villosités d'ancrage s'agrègent dans les colonnes et envahissent l'endomètre.

Les cytotrophoblastes endovasculaires qui remodelent les vaisseaux sanguins utérins transforment leurs récepteurs d'adhésion en récepteurs d'adhésion des cellules endothéliales, qui expriment des cadhérines vaso-endothéliales, de la molécule d'adhésion 1 plaquette-endothéliales, et de la molécule d'adhésion 1 d'adhésion vaso-endothéliale. Les cytotrophoblastes expriment des molécules

influençant la vasculogénèse et l'angiogénèse, comme les facteurs de croissance endothéliaux vasculaires. L'expression de ces molécules change selon que les cellules se différencient ou envahissent, et elles régulent la survie des cytotrophoblastes dans la vascularisation remodelée de l'utérus.

Un environnement pro-inflammatoire se met en place pour permettre l'invasion des cytotrophoblastes et la placentation. Une étude menée en 2005 sur des explants placentaires de début et de fin de grossesse démontre qu'en début de grossesse, l'expression d'IL-6 est élevée tandis que les taux de RANTES et IL-16 sont bas (Faye et al. 2005). La production du facteur de croissance VGEFC permet l'invasion de l'endomètre par les trophoblastes.

2.2 Deuxième trimestre de grossesse

Vers le 4^{ème} mois de grossesse, la plaque basale va se plisser et former des cloisons incomplètes. Les cotylédons, unités composées des villosités flottantes, se forment. Les cytotrophoblastes envahissent la caduque, le myomètre et la lumière des artères spiralées. Cette invasion des vaisseaux maternels conduit à la destruction des cellules musculaires lisses qui sont remplacées par du tissu fibreux.

La balance immunitaire penche en Th2 et amène une tolérance immunitaire de la mère au fœtus, permettant son développement. L'interleukine anti-inflammatoire IL-10 est alors fortement exprimée. Au milieu de la grossesse, les cytotrophoblastes invasifs remplacent complètement la couche endothéliale et la plupart du muscle lisse des artérioles, formant une vascularisation hybride composée de cellules maternelles et fœtales. Au 5^{ème} mois, la couche de cytotrophoblastes

entourant les villosités disparaît, les villosités à terme sont formées (Gude et al., 2004).

2.3 Troisième trimestre de grossesse

Le dernier trimestre est celui de la préparation à l'accouchement. La balance immunitaire penche en Th1 et diverses cytokines sont exprimées pour induire un état pro-inflammatoire. L'étude menée par *Faye et al* sur les explants de fin de grossesse montre dans les placentas à terme, les taux de RANTES et IL-16 sont élevés, et le taux d'expression d'IL-10 est très bas comparé aux explants de premier trimestre. A noter que l'expression des cytokines pro-inflammatoires TNF- α et IFN- γ sont faibles durant ce trimestre (Faye et al., 2005)(Veith and Rice, 1999). Les cytokines de type Th1 vont stimuler la production de IL-8 et de prostaglandine qui sont impliquées dans les contractions utérines. (Kayem and Batteux, 2008)

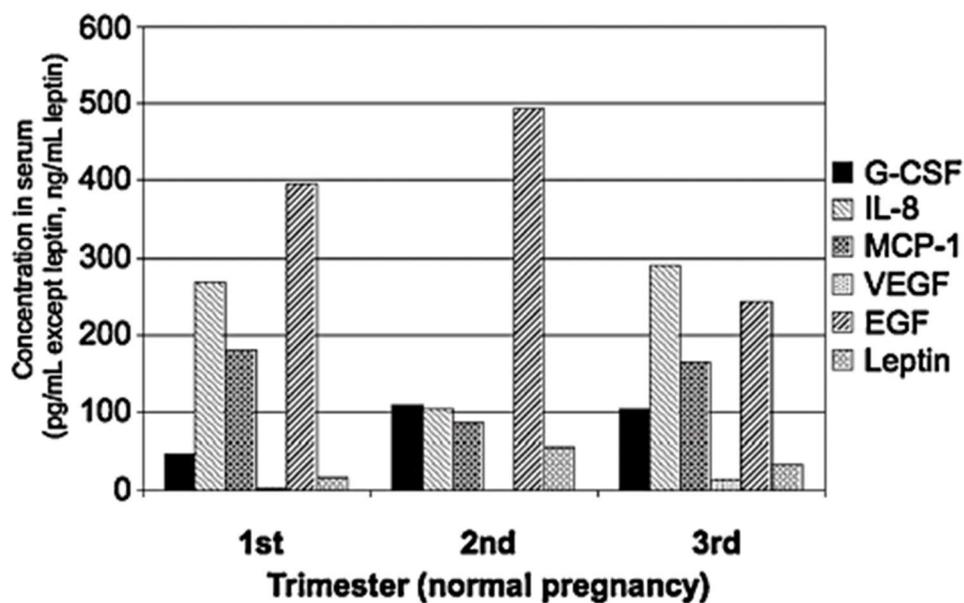


Figure n°3: Evolution de la concentration dans le sérum de cytokines et facteurs de croissance au long des trois trimestres de grossesse. D'après (Koga et al. 2009)

3. La grossesse, un paradoxe immunitaire

La grossesse est un état immunitaire particulier, similaire à une greffe semi-allogénique. Si le placenta est une barrière entre la mère et le fœtus, il n'empêche cependant pas le passage des effecteurs de l'immunité. En effet, le non-rejet du fœtus ne signifie pas arrêt du système immunitaire. Cependant, différents mécanismes permettent l'établissement d'une tolérance de la mère vis-à-vis du fœtus.

3.1. Immunité maternelle

Lors de la grossesse, l'immunité globale de la femme enceinte change, probablement sous l'action des hormones stéroïdes dont la progestérone. Les composants de la réponse immunitaire innée dans le contexte de l'infection congénitale et périnatale comprennent les cellules tueuses naturelles (cellules NK), les récepteurs Toll-like (TLR) et des cytokines.

On observe que l'immunité cellulaire de la femme diminue légèrement ; en effet, l'activité des cellules NK baisse, tandis que l'activité des lymphocytes T s'oriente vers un profil immunosuppresseur (voir figure n°4). L'immunité humorale quant à elle n'est pas modifiée, les immunoglobulines sont en quantité normale, hormis les IgG qui diminuent au 3^{ème} trimestre. Au long de la grossesse, le pourcentage de cellules NK va augmenter durant le premier trimestre de grossesse pour ensuite diminuer jusqu'au terme, tandis que les lymphocytes Treg diminueront en fin de grossesse.

1. L'interface syncytiotrophoblastes/espace intervilloux sanguin maternel
2. Interface chorion/espace intervilloux sanguin maternel
3. Interface cytotrophoblaste extravilloux/sang périphérique des artères maternelles spiralées
4. Interface cytotrophoblaste extravilloux/décidua (côté basal)

Nous détaillerons l'immunité présente aux niveaux de ces interfaces.

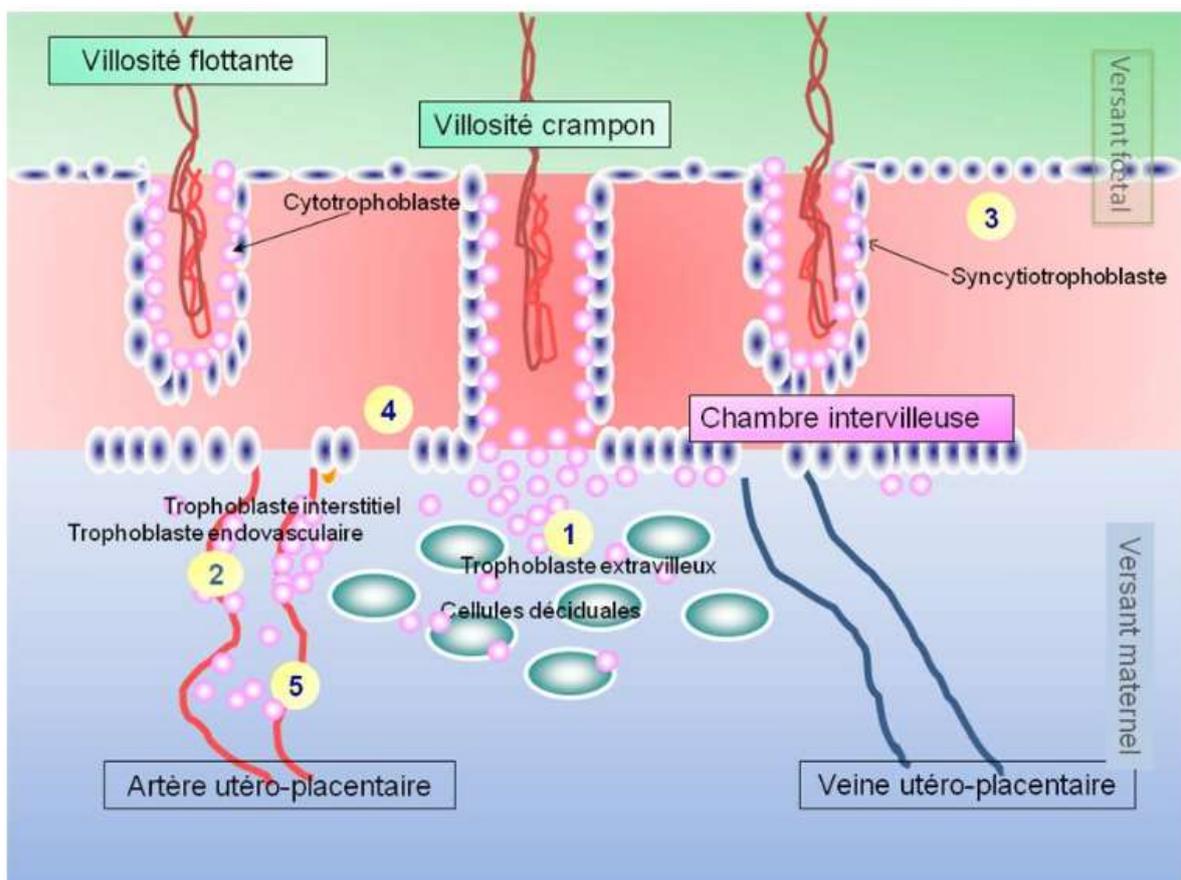


Figure n°5: Schéma représentant les différentes interfaces materno-fœtales placentaires. 1) Interface entre les cellules déciduales et les trophoblastes extravilloux 2) Interface entre les trophoblastes endovasculaires et les parois des artères utérines 3) Interface entre les syncytiotrophoblastes et villositaires et le sang maternel 4) Interface entre le chorion et la chambre intervillouse 5) Interface créée par les cellules trophoblastiques présentes dans la circulation sanguine maternelle. D'après (Mesdag et al., 2014)

3.2.1 Immunité à l'interface décidua/cytotrophoblastes extravilloux

La distribution des effecteurs de l'immunité dans la décidua diffère de celle retrouvée dans le sang périphérique maternel. En effet, on retrouve majoritairement des cellules NK (70%), des cellules de type macrophage CD14+ (20%), des cellules dendritiques, T CD4+, cellules NK tueuses (NKT) et plus rarement des cellules CD8+ et lymphocytes B.

Les macrophages déciduaux sont impliqués dans des processus immunosuppresseurs. En effet, ces macrophages sont plutôt de type M2, et produisent donc des médiateurs anti-inflammatoires tels IL-10, le TGF- β ainsi que l'enzyme indoléamine 2.3 dioxygénase (IDO), enzyme dégradant le tryptophane qui est utilisée par les cellules T, ce qui permet la tolérance de la mère vis-à-vis du fœtus (Mesdag et al., 2014). Les cellules NK présentes dans la décidua sont impliquées dans la sécrétion de facteurs favorisant l'angiogenèse tels VEGF et l'angiopoïétine-2, les cytokines et facteurs de croissance placentaires TNF- α , IL-10, GM-CSF, IL-1 β , TGF- β 1, CSF-1, LIF, et IFN- γ (Lee et al., 2011)

Les syncytiotrophoblastes et les cytotrophoblastes constituant les villosités n'expriment pas d'antigènes d'histocompatibilité (complexe HLA-A-B-C complexe majeur d'histocompatibilité), ce qui leur permet de ne pas être reconnus par les lymphocytes T cytotoxiques comme cellules étrangères. Cependant, l'absence de CMH est un signal pour les cellules NK, qui détruisent les cellules ne présentant pas de marques HLA classiques. Les trophoblastes vont donc exprimer un HLA modifié qui est spécifique à l'état de grossesse, nommée HLA-G. La reconnaissance de ce marqueur par les cellules NK inhibe leur action.

3.2.2 Immunité à l'interface villosité choriale/sang maternel

Les syncytiotrophoblastes en contact avec le sang maternel sont en contact avec différentes cellules effectrices de l'immunité que l'on retrouve dans le sang périphérique : lymphocytes T CD8+, T CD4+, cellules NK, cellules dendritiques...

3.3 Protection contre les pathogènes.

De nombreuses espèces bactériennes et virales peuvent être détectées aux interfaces materno-fœtales. (McDonagh et al., 2004). Les syncytiotrophoblastes sont une barrière physique face à de nombreux pathogènes, bactériens ou viraux (Robbins et al., 2010),(Koi et al., 2002). De plus, la présence des effecteurs de l'immunité acquise ou innée aux différentes surfaces materno-fœtales assure une protection contre les pathogènes.

4. Infection par les pathogènes microbiens à la surface materno-fœtale.

Le placenta est une barrière physique séparant la mère et fœtus. Cependant, durant la grossesse, des micro-organismes pathogènes peuvent traverser cette barrière (voir figure n°6) et être transmis de la mère au fœtus par différents mécanismes. La transmission de ces pathogènes peut se produire depuis les cellules déciduales aux villosités flottantes et d'ancrage, la voie sanguine peut également jouer un rôle dans la transmission des pathogènes, vu que les cytotrophoblastes envahissent la vascularisation utérine (Maidji et al., 2002). Une infection bénigne pour la mère peut devenir mortelle pour le fœtus. Nous ferons un point dans ce chapitre sur les pathogènes responsables d'infections congénitales chez l'être humain.

Pathogène (maladie)	Type	Transmission	Mode de vie	Tropismes connus
<i>Burcella spp.</i> (Brucellose) ^{a,b,c,d,e}	B	Ingestion	Principalement I	Leucocytes, épithélial
<i>Coxiella burnetii</i> (fièvre Q) ^{c,e,h}	B	Inhalation	I obligatoire	Leucocytes
<i>Listeria monocytogenes</i> (Listériose) ^{a,b,c,d,g,h}	B	Ingestion	I/E	Épithélial, phagocyte
<i>Mycobacterium tuberculosis</i> (Tuberculose) ^{d-g}	B	Voies aériennes	Principalement I	Leucocytes
<i>Treponema pallidum</i> (Syphilis) ^{b,c,f,g}	B	Sexuelle	Principalement E	Inconnu
<i>Leishmania spp.</i> (Leishmaniose) ^h	P	Vecteur animal	I/E	Leucocytes
<i>Plasmodium falciparum</i> (Malaria) ^{a,b,d,g}	P	Vecteur animal	I obligatoire	Erythrocytes, hépatocytes
<i>Toxoplasma gondii</i> (Toxoplasmose) ^{a,b,d,g}	P	Ingestion	I obligatoire	Cellules nucléées
<i>Trypanosoma spp.</i> (Maladie de Chagas) ^{e,g}	P	Vecteur animal	I/E	Epi/endothélial
Cytomegalovirus (CMV) ^{a,b,d,g}	V	Sécrétions	I obligatoire	Leucocytes, trophoblastes
Lymphocytic choriomeningitis virus (LCMV) ^{a,b,f,g}	V	Ingestion, inhalation	I obligatoire	Leucocytes
Parvovirus B19 ^{a,b,c,d,f}	V	Sécrétions	I obligatoire	Hématopoïétique, endothélial
Rubella virus (Rubéole) ^g	V	Sécrétions	I obligatoire	Varié
Varicella zoster virus (varicelle, zona) ^{g,h}	V	Voies aériennes	I obligatoire	Leucocytes, neurones, épithélial

Figure n°6: Tableau résumant les différents pathogènes capables de traverser la barrière placentaire. ^a : mort fœtale au premier trimestre de grossesse; ^b : mort fœtale au troisième trimestre de grossesse; ^c : enfant mort-né; ^d : accouchement précoce; ^e : croissance intra-utérine retardée; ^f : hydrops fœtal; ^g : infection néonatale sévère; ^h : sévérité de la maladie maternelle accrue. Type B: Bactérie; P: Protozoaire; V: Virus. Mode de vie E: extracellulaire; I: Intracellulaire. D'après Robbins and Bakardjiev, 2012

4.1 Infections bactériennes

La listériose, maladie induite par un bacille gram-positif, *Listeria monocytogenes*, peut être responsable d'avortements spontanés, de mort *in utero* et de septicémie néo-natale due à une contamination transplacentaire ou à des atteintes méningées plus tardives secondaires à la contamination dans les voies génitales lors de l'accouchement. La bactérie va infecter le fœtus via les villosités d'ancrage, en passant de cellule en cellule. Cependant, les syncytiotrophoblastes semblent être une barrière physique efficace contre cette bactérie (Robbins et al., 2010).

La gonorrhée dont l'agent pathogène est le gonocoque (*Neisseria gonorrhoeae*), peut être responsable de salpingites postnatales chez la mère. Les enfants, par transmission verticale, peuvent être infectés lors de l'accouchement, et développer une ophtalmie gonococcique.

Le tréponème pâle (*Treponema pallidum*), agent de la syphilis est transmis par voie sexuelle. Il peut potentiellement traverser le placenta dès la 9ème semaine de grossesse, mais ce passage n'est démontré qu'à partir de la 14ème semaine et classiquement avec certitude à partir de la 20ème semaine de grossesse, et infecter le fœtus directement via la circulation sanguine (voie de transmission principale), il peut également être contracté par le nouveau-né lors de la délivrance (phénomène plus rare). L'infection du fœtus par ce spirochète peut conduire à des avortements spontanés, une mortinatalité ou encore une prématurité avec atteinte syphilitique. 40% des enfants infectés seront symptomatiques, présentant les stigmates congénitaux suivants: atteintes cutanées (éruption cutanées, lésions bulleuses, desquamation), problèmes respiratoires, hépatomégalie, atteintes osseuses (Sánchez et al., 2012).

4.2 Infections parasitaires

Le parasite *Plasmodium falciparum*, responsable du paludisme, est transmis par les piqûres de moustiques (anophèles). 7% des nouveaux nés dans les zones à risques subissent les effets de la malaria sur la mère. En effet, l'anémie provoquée par la maladie peut générer de l'hypoxie (Alvarez et al., 2005). Le symptôme le plus courant en cas d'infection est l'apparition de fièvre, suivie par l'anémie, la splénomégalie et l'hépatomégalie (Sánchez et al., 2012).

La toxoplasmose, maladie causée par le protozoaire *Toxoplasma gondii*, est une affection bénigne pour la mère, mais peut être responsable d'anomalies graves chez le fœtus. Ce parasite est un hôte des rongeurs et des félins, l'être humain étant une impasse dans son cycle de vie. Le risque de transmission augmente avec le nombre de semaines de grossesse, passant de 10% aux alentours de la cinquième semaine à 80% en fin de grossesse (Kieffer and Wallon, 2013).

4.3 Infections virales

Même si le placenta est une barrière efficace contre les pathogènes viraux (Burton and Watson, 1997), de nombreux virus peuvent traverser la barrière placentaire et infecter le fœtus durant la grossesse. Les infections virales sont impliquées dans de nombreux cas de morts *in utero* ou à la naissance (Williams et al., 2013).

Parmi les virus pouvant infecter le fœtus on retrouve des virus à ADN de la famille des herpès virus tels le CMVH, l'herpès simplex (HSV-1 et 2), ainsi que le virus de la varicelle et du zona (VZV). Cependant l'infection par l'HSV se fera généralement lors de l'accouchement plutôt que *in utero*. Certains symptômes causés par ces virus sont similaires: atteintes au niveau cérébral, perte d'audition, retard de croissance, mort fœtale *in utero* (Baldwin and Whitley, 1989).

Le parvovirus B19 est un virus à ADN simple brin qui est le seul représentant des parvovirus à provoquer des symptômes chez l'homme. Lorsqu'il est contracté pendant les premières semaines de grossesse, il peut conduire à des fausses couches. Il est aussi responsable d'œdème généralisé (anasarque) (Al-Khan et al.,

2003), mais également d'hépatomégalie ou encore d'anémie (Schleiss and Patterson, 2012).

Les virus responsables d'hépatites peuvent infecter le fœtus, notamment le virus de l'hépatite B (HBV) et de l'hépatite C (HCV). Si les infections par le VHC sont transplacentaires, la contamination se faisant par le sang; le VHB, également, présent dans les sécrétions génitales, est plus fréquemment transmis lors de l'accouchement et son infection peut être prévenue par la vaccination précoce du nouveau-né.

Le virus de l'immunodéficience humaine (VIH) peut infecter le fœtus *in utero* en toute fin de grossesse mais essentiellement le nouveau-né lors de la délivrance ou de l'allaitement. En effet, du fait du manque de récepteurs, le virus infecte difficilement les cellules placentaires. Ce virus n'induit pas de malformations congénitales. Cependant, le VIH peut conduire à des encéphalopathies lorsque la charge virale est élevée à la naissance (Tardieu et al. 2013). La transmission de l'infection à VIH peut actuellement être évitée par les traitements antiviraux administrés au cours de la grossesse.

Le virus de la rubéole est un virus enveloppé à ARN de polarité positive. Il peut être à l'origine de cataracte, de complications cardiaques, de surdité. La prévalence des lésions suite à l'infection par ce virus varie selon le trimestre de grossesse, passant de 85% lors des douze premières semaines de grossesse à moins de 25% à partir du second trimestre (Schleiss and Patterson, 2012). Ce virus était la première cause d'infection virale congénitale jusque dans les années 1970.

En effet, la vaccination grâce à un virus vivant atténué, a permis depuis 1969 de réduire la prévalence mondiale de la rubéole congénitale.

Le papillomavirus humain (HPV) est le virus le plus transmis par voie sexuelle, impliqué dans des cancers ou la formation de condylomes. Le virus est détecté de façon significative dans des placentas provenant d'avortement spontanés (Gomez et al., 2008) (Freitas et al. 2013). De nombreuses souches d'HPV sont capables d'infecter des lignées trophoblastiques *in vitro*, suggérant une possibilité d'infection *in utero* (You et al., 2008). Cependant le papillomavirus est essentiellement transmis à la naissance, par contact avec les sécrétions cervicales et les voies génitales. Les enfants infectés peuvent développer des lésions dues au virus, notamment au niveau du larynx (papillomatose laryngée) (Syrjanen and Puranen, 2000).

Depuis la vaccination généralisée contre la rubéole, la première cause virale d'infection placentaire et de maladies congénitales est le CMVH.

Chapitre 2: Infection congénitale à CMVH

Comme nous l'avons vu précédemment, le CMVH est la première cause d'infection congénitale virale au niveau mondial. Dans ce chapitre après une introduction sur le virus et sa physiopathologie, nous développerons les mécanismes et les conséquences de l'infection placentaire à CMVH.

1. Structure et génome du CMVH

Le cytomégalovirus humain ou Human Herpesvirus 5 appartient à la famille des *Herpesviridae*, famille virale de virus à ADN qui regroupe les sous familles des α -, β et γ -*herpesvirinae*. Au même titre que les roséolovirus (HHV6 et HHV 7), le CMVH est un β -*herpesvirinae*.

TABLE 1. Classification of human herpesviruses

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

Figure n°7: Tableau récapitulatif des sous-familles des herpès virus. (Crough and Khanna, 2009)

1.1 Structure de la capside virale

Le CMVH est un virus enveloppé d'environ 200 à 300 nm de diamètre, ce qui en fait le plus volumineux des virus de la famille des *herpesviridae*.

La capside virale, un icosaèdre d'un diamètre de 130 nm, est composée majoritairement par la protéine majeure de capsid (MCP) pUL86. Les faces de l'icosaèdre sont constituées de 150 hexamères (6 MCP), séparés par douze pentamères (6MCP). L'un des pentamères est formé par l'association des protéines «portail» codées par le gène *UL104*. Ce penton spécifique est impliqué dans l'encapsidation de l'ADN viral. La protéine mineure de capsid (SCP) pUL85, est associée aux MCP, permettant l'assemblage de la capsid lors de la morphogénèse.

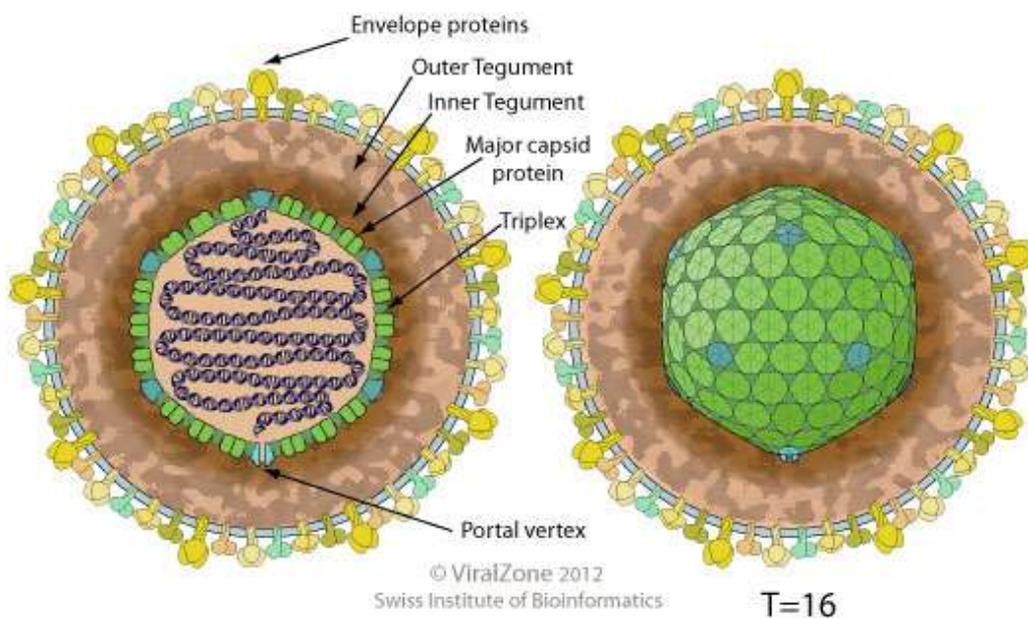


Figure n°8: Schéma représentant la structure de la capsid virale du CMVH (source: http://viralzone.expasy.org/all_by_species/180.html)

1.2 Le tégument

Le tégument est une structure protéique amorphe située entre la couche lipidique de l'enveloppe et la capsidie icosaédrique. La protéine pp65 est la protéine majeure du tégument (Iii, 2012), bien qu'elle ne soit pas indispensable pour la réplication du virus *in vitro*, elle est impliquée dans de nombreuses interactions avec des kinases de l'hôte *in vivo*. De par son abondance cette protéine est l'antigène détecté lors du diagnostic de l'infection à CMVH.

Les protéines pp150 et pp28 sont impliquées dans la formation des capsides virales et la sortie nucléaire des néovirions, mais leurs fonctions sont différentes. En effet, pp150, qui est la deuxième protéine majeure du tégument du CMVH, serait impliquée dans le maintien de la capsidie tandis que pp28 aurait plutôt un rôle dans l'enveloppement cytoplasmique des capsides néoformées. Pp150 a également un rôle dans la régulation de l'expression des gènes très précoces (*immediate early*) en étant un substrat pour la cycline A2 (Bogdanow et al., 2013).

1.3 L'enveloppe virale

L'enveloppe du CMVH est dérivée des membranes de la cellule-hôte. Elle porte à sa surface des glycoprotéines (gp) : gB, gH, gL, gO, gM et gN, codées respectivement par les gènes *UL55*, *UL75*, *UL115*, *UL74*, *UL100* et *UL73* (Britt, 2007). Le constituant le plus abondant dans l'enveloppe est la protéine gB, qui est impliquée dans l'attachement du virus et la fusion avec la membrane de la cellule hôte. Les protéines gH, gL et gO forment des complexes impliquées dans le tropisme cellulaire (Scrivano et al., 2011). Ces protéines sont essentielles à l'adsorption de la

particule virale sur les récepteurs cellulaires, à la fusion des membranes virales et cellulaires, ainsi qu'à l'assemblage et à la libération des néovirions produits par la cellule hôte infectée.

1.4 Génome

Le génome du CMVH, d'une longueur de 235 kpb, est le plus grand de la famille des *Herpesviridae*. Il est constitué d'un ADN double brin, composé de deux régions, la région unique longue (UL) et la région unique courte (US), flanquées par des séquences répétées inversées terminales nommées TR. Ces séquences terminales sont désignées TRL pour UL et TRS pour US. Il existe également des séquences répétées internes (IR): IRL pour UL et IRS pour IR. Des recombinaisons survenant pendant la réplication permettent la formation de quatre isomères du génome selon le sens de lecture des régions UL ou US. Plus de 200 cadres ouverts de lecture (ORF) existent dans le génome viral, ainsi, le CMVH peut coder près de 170 protéines.

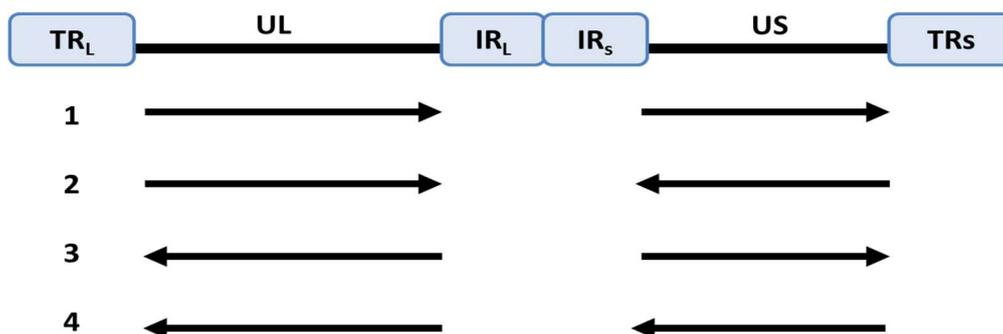


Figure n°9 : Génome simplifié du CMVH et représentation des quatre isomères possibles, notés de 1 à 4. UL: Région unique longue; US: région unique courte; TRL: séquence répétée terminale de la région longue; TRS: séquence répétée terminale de la

région courte; IRL: séquence répétée interne de la région longue; IRS: séquence répétée interne de la région courte.

2. Physiopathologie de l'infection à CMVH

La principale manifestation de l'infection des cellules par le CMVH est l'apparition de corps d'inclusion dans le cytoplasme, donnant ainsi un aspect en « œil de hibou » ainsi que la ballonnisation des cellules ou cytomégalie (voir figure n°10). Cet effet cytopathique est aussi bien observé *in vitro* qu'*in vivo*. Cependant, il varie selon les lignées cellulaires et les souches virales.

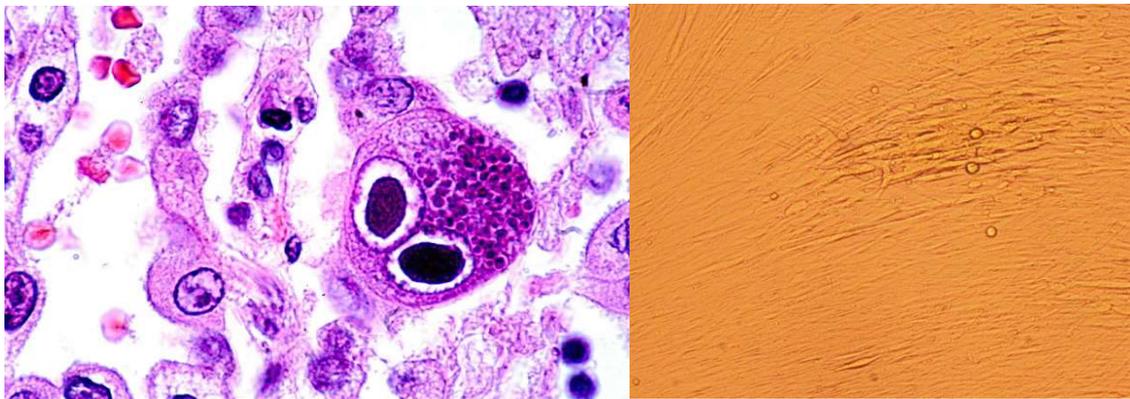


Figure n°10: «Oeil de hibou» formé par les corps d'inclusion (photo de Danny L Wiedbrauk) et foyer de cellules ballonnées observé au microscope inversé au grossissement x 40.

2.1 Tropisme cellulaire

In vivo, le tropisme cellulaire du CMVH est très étendu. En effet, il peut se répliquer dans des cellules endothéliales, épithéliales, dendritiques mais également dans les macrophages, les fibroblastes, les cellules nerveuses. Cette capacité d'infection ubiquitaire lui permet de toucher tous les organes. Au niveau du tractus

gastro-intestinal, le CMVH est retrouvé dans les cellules épithéliales, endothéliales, les cellules musculaires lisses (Sinzger et al., 1995).

2.2. Attachement et entrée dans la cellule

L'entrée du virus dans la cellule est précédée par une phase d'attachement où les héparanes sulfates cellulaires interagissent avec les complexes gM/gN et gB viraux (Compton, 2004). Le virus va s'attacher à la membrane des cellules par des récepteurs spécifiques, encore mal connus. Les récepteurs les plus décrits sont le récepteur à l'Endothelial Growth Factor (EGF-R), Dc-sign et le récepteur au Platelet Derived Growth Factor (PDGF-R). Différents gènes sont impliqués dans le tropisme cellulaire du virus. Il a été démontré que les complexes protéiques gH/gL et gH/gL/gO de l'enveloppe virale sont nécessaires à l'infection cellulaire. Le niveau d'expression de pUL128 influence le tropisme endothélial ou fibroblastique (Sinzger, 2008). Plus récemment et il a été démontré que les gènes viraux *UL135* et *UL136* sont impliqués dans le tropisme endothélial du virus (Buglio et al., 2015). L'entrée du virus dans la cellule peut alors se faire par endocytose, comme c'est le cas pour les cellules endothéliales (Sinzger, 2008) ou par fusion de la membrane cellulaire et de la membrane virale. Une fois entré dans la cellule, le génome viral peut être exprimé.

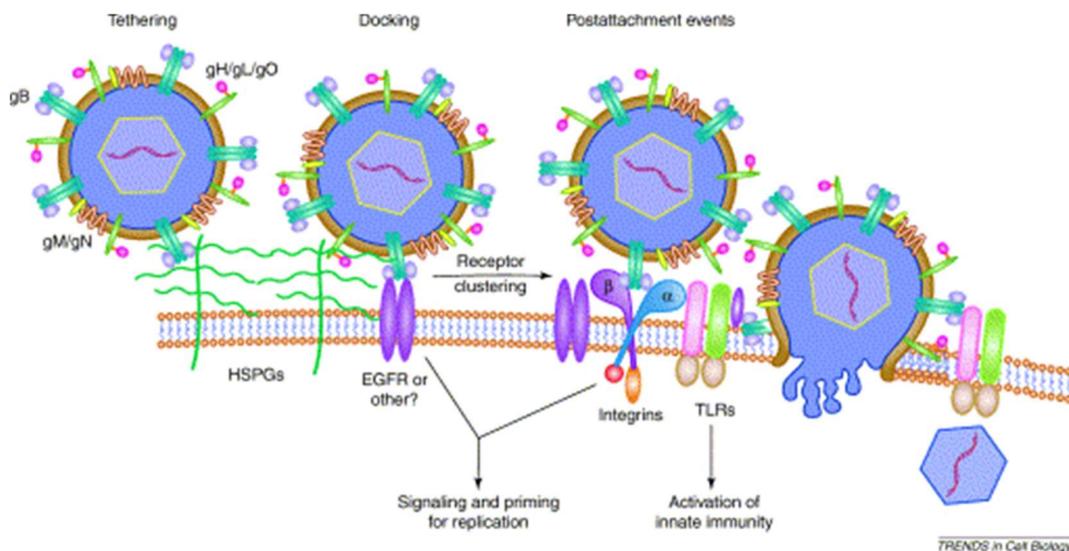


Figure n°11 : Illustration du mécanisme d'entrée du CMVH dans les cellules. Le virus s'attache aux héparanes sulfates présentes à la surface cellulaire avant de se lier à l'EGFR via les protéines d'enveloppe gB. La protéine gH se lie aux intégrines. Après fusion des membranes cellulaires et virales, la nucléocapside est libérée dans le cytoplasme avant acheminement au noyau. (Compton, 2004)

2.3 Cycle de réplication

Le cycle de réplication du CMVH se déroule entre 24 et 48H après l'endocytose. Son cycle se décline en trois phases: tout d'abord les gènes très précoces (*immediate early*, IE) ou de classe « α », qui, comme nous l'avons vu précédemment, s'expriment immédiatement après l'entrée du cytomégalovirus dans la cellule. Ces gènes permettent l'activation des phases suivantes de la réplication.

La seconde étape, dite précoce, est l'étape d'expression des gènes précoces E (*early*) ou de classe « β » qui codent des protéines non structurales du virus comme des facteurs de réplication de l'ADN ou encore des protéines impliquées dans l'évasion immunitaire du virus. Les protéines précoces-tardives sont impliquées dans la réplication de l'ADN et dans la régulation des gènes tardifs du CMVH.

Enfin les protéines tardives, codées par les gènes tardifs ou *late* (L), de classe « γ » vont participer à la morphogénèse du virus.

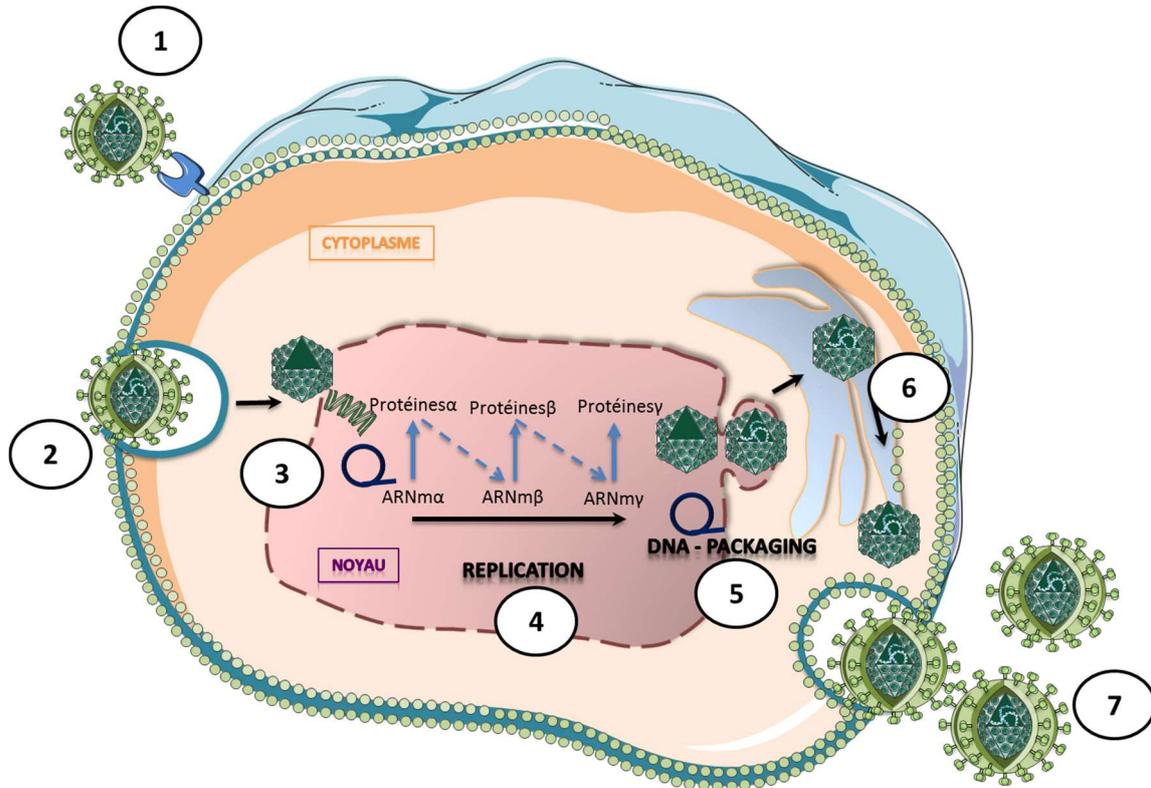


Figure n°12: Schéma simplifié du cycle de réplication virale du CMVH. 1. Liaison du virus à la cellule via des récepteurs. 2. Entrée du virus par fusion membranaire ou endocytose. 3. Entrée de l'ADN viral dans le noyau et circularisation. 4. Production des protéines virales et réplication de l'ADN. 5. Encapsidation des concatémères d'ADN viral dans les capsides néoformées. 6. Acquisition des membranes dans le Golgi. 7. Libération des virions par exocytose.

2.3.1 Etapes précoces de la réplication virale

L'expression des gènes très précoces du CMVH se déroule rapidement, entre 4 et 8 heures après l'infection, et régule l'expression de facteurs cellulaires tel NF- κ B, elles ont également un rôle dans leur propre régulation et celle des gènes précoces. La protéine IE2, codée par le gène *UL123*, a pour fonction de moduler l'expression

des gènes très précoces, son expression est importante en début et fin du cycle de réplication. La protéine IE1 codée par le gène *UL122* agit en tant que cofacteur de la protéine IE2 et stimule de nombreux promoteurs viraux et cellulaires.

Les protéines UL36 et UL37 sont des facteurs inhibant l'apoptose, ainsi que TRS1 et IRS1. La protéine US3 empêche l'expression des molécules du CMH-1 et donc la présentation de l'antigène du CMVH au système immunitaire (Mocarski, 2004).

2.3.2 Phase précoce et réplication de l'ADN

Cette phase se déroule jusqu'à vingt-quatre heures post-infection. En plus des protéines associées dans la réplication de l'ADN, certaines protéines du téguement sont synthétisées (pp65, pp71 et pp150), le gène *US11*. La réplication du virus se produit dans le noyau de la cellule, généralement 16H après l'infection, et est initiée par des phosphoprotéines codées par les gènes *UL112* et *UL113* (Mocarski and Courcelle, 2001) L'ADN polymérase et son co-facteur sont codés par les gènes *UL54* et *UL44*. Le complexe hélicase-primase est quant à lui composé de trois protéines codées par les gènes *UL70*, *UL102* et *UL105*.

La réplication de l'ADN s'effectue selon un modèle de cercle roulant. En effet, l'ADN viral néoformé est circularisé puis répliqué en une multitude de copies assemblées bout à bout, formant une longue molécule d'ADN bicaténaire nommée concatémère. Chaque unité de génome est liée à des séquences répétées et inversées riches en base AT (les séquences *pac*, *cis-acting packaging elements*), qui sont des signaux de clivage et d'encapsidation (Mocarski and Courcelle, 2001).

2.3.4 Etapes tardives de la réplication virale

Les protéines tardives sont transcrites environ 24H après l'infection. Parmi ces protéines se trouvent majoritairement les protéines de capsid, de l'enveloppe ainsi que γ IE2_{338aa} impliquée dans la régulation de gènes viraux et cellulaires (Landolfo et al., 2003). La kinase virale pUL97 est également transcrite lors de cette phase. Cette protéine est indispensable à la réplication du virus, en effet, elle permet de phosphoryler diverses protéines virales dont pUL44, pUL69 et pp65 (Marschall et al., 2011).

2.3.5 Maturation et sortie du virus

Les protéines de capsides sont transférées du cytoplasme au noyau. Une fois arrivées au noyau, les composants vont interagir entre eux pour former les pentamères et hexamères qui constitueront la capsid. Les protéines UL85 et UL46 quant à elles vont former un triplex. L'association des pentamères/hexamères avec les triplex aboutit à une pré-capsid. L'ADN viral va être inséré dans la capsid par le complexe pUL56-pUL89 via le portail formé par la protéine pUL104 (Britt, 2007).

Trois types de capsides peuvent apparaître: le type A est une capsid dépourvue d'ADN, conséquence d'un défaut d'encapsidation du génome viral. Le type B est un précurseur de capsid mature contenant des protéines d'assemblage au lieu de l'ADN viral. Enfin, le type C correspond aux nucléocapsides matures.

Une première enveloppe entoure la néocapsid par bourgeonnement à la membrane nucléaire. Après passage dans le lumen, le néovirion fusionne avec la membrane du réticulum endoplasmique et perd sa première membrane. Le tégument est acquis dans le cytoplasme, et l'enveloppe définitive provient de

l'altération de l'appareil de Golgi. Les néovirions vont s'accumuler dans des corps d'inclusion donnant l'aspect «oeil de hibou» caractéristique de l'infection à CMVH. Enfin, les virions vont achever leur cycle lytique en quittant la cellule par exocytose, acquérant ainsi leurs dernières protéines de surface.

2.4 Impact de l'infection à CMVH sur le cycle cellulaire

Dès son entrée dans la cellule, le virus induit un phénomène de pseudomitose (Hertel and Mocarski, 2004). En effet, le virus agit sur la modulation des cyclines et des cyclines kinases dépendantes (cdks) pour maintenir les cellules dans un état permanent de pseudo-G1. Au cours de la phase précoce de son cycle de réplication, la transcription des cyclines A est inhibée, tandis que la transcription de la cycline E est induite, ce qui permet l'augmentation de l'activité du complexe Cdk2/cyclineE. Ce complexe contrôle la transition G/S du cycle cellulaire. L'entrée en phase M est régulée par le complexe Cdk1/cycline B1. Le taux élevé de ces complexes dans les cellules infectées par le virus peut être à l'origine de l'état de pseudomitose observé (Trincado and Rawlinson, 2001).

Paradoxalement, cet arrêt du cycle cellulaire s'accompagne d'une surexpression de certaines protéines impliquées dans la progression du cycle, comme la cycline B1. La kinase virale pUL97 phosphoryle les protéines virales. Cette activité de phosphorylation est également observée sur des protéines cellulaires telles les lamines nucléaires, la protéine p32, Rb, l'ARN pol II et EF-1 (Marschall et al., 2011). La protéine du rétinoblastome pRb est inactivée par pUL97.

2.5 Impact de l'infection à CMVH sur la production de cytokines

Le génome du CMVH code des analogues des chimiokines, notamment CMV-IL-10, analogue de la chimiokine IL-10. Une étude menée par Hamilton et al sur des fibroblastes infectés par la souche de laboratoire AD169 montre l'impact du virus sur l'expression des ARN messagers et la production protéique de MCP-1 et CXCL10 dans les cellules et les surnageants de culture de fibroblastes (Hamilton et al., 2012). De plus, la protéine virale IE2 bloque l'expression de nombreuses cytokines inflammatoires telles IL-8, MCP-2, MIG, MIP-1a, et RANTES, mais peut également induire la production de l'interféron IFN- γ et l'interleukine IL-6 (Paulus and Nevels, 2009).

2.6 Latence et réactivation

La latence est une des caractéristiques communes aux *Herpesviridae*, permettant au virus d'échapper au système immunitaire et de se maintenir tout au long de la vie de l'individu infecté. Elle se caractérise par la persistance du génome sous forme d'un épisode et la réduction d'expression des gènes viraux associée à l'expression de transcrits de latence. Les principaux sites de latence sont les cellules endothéliales et les cellules myéloïdes, notamment les précurseurs médullaires CD34+ et les monocytes CD14+. Les mécanismes impliqués dans la réactivation virale ne sont pas clairement établis. Cependant, elle est corrélée à une baisse de l'immunité. L'expression d'un facteur viral homologue à IL-10 (CMV IL-10), produit du gène US111A, augmente lors de l'état de latence (Jenkins et al., 2008), (Jenkins et al., 2004). Un modèle de réactivation du virus lors de la différenciation du monocyte en macrophage ou cellule dendritique, a été proposé (Sinclair, 2006). *In vitro*,

l'intervention des lymphocytes T CD8⁺ associée à la production de cytokines telles TNF- α et l'IFN- γ sont nécessaires à la différenciation des monocytes en macrophages en présence de concanavaline A, tandis que, lors d'une stimulation allogénique, les cytokines induisant la réactivation sont l'IFN- γ et l'IL2. Dans les deux cas la différenciation en macrophage induit la réactivation du virus.

2.7 Echappement au système immunitaire

Outre la latence, le CMVH possède de nombreuses stratégies pour échapper au système immunitaire. Par exemple, la protéine Immediate early 1 (IE1) bloque la présentation des antigènes dérivés d'IE via les molécules CMH I, inhibant ainsi la réponse des lymphocytes T cytotoxiques à ces antigènes viraux. Les gènes viraux *US2*, *US3*, *US10* et *US11* sont responsables de la séquestration et la dégradation des molécules du CMH I dans la cellule infectée via le protéasome, empêchant ainsi leur expression (Furman et al., 2002). Le gène *US2* est également impliqué dans l'inhibition de la présentation de l'antigène par les molécules de CMH II (Seliger et al., 2006).

L'inhibition des CMH de classe I et II diminue probablement les réponses T *helper* et cytotoxique spécifiques au CMVH. Cependant, l'inhibition de l'expression du CMH I devrait rendre les cellules infectées sensibles à l'action des cellules natural killer (NK) qui reconnaissent les cellules dépourvues du CMH de classe I. Afin d'échapper à l'action cytotoxique des NK, le CMVH, via ses gènes *UL18* et *UL40*, code des analogues de molécule du CMH I, qui se lient avec le récepteur NKG2A/CD94 des NK, inhibant ainsi leur activité cytotoxique (Miller-Kittrell and Sparer, 2009) (Mocarski, 2004).

Des récepteurs membranaires viraux codés par le gène *US28* sont capables de capter et séquestrer des cytokines pro-cytotoxiques comme RANTES, MCP-1, MCP-3 et MIP-1 α (Vomaske et al., 2009).

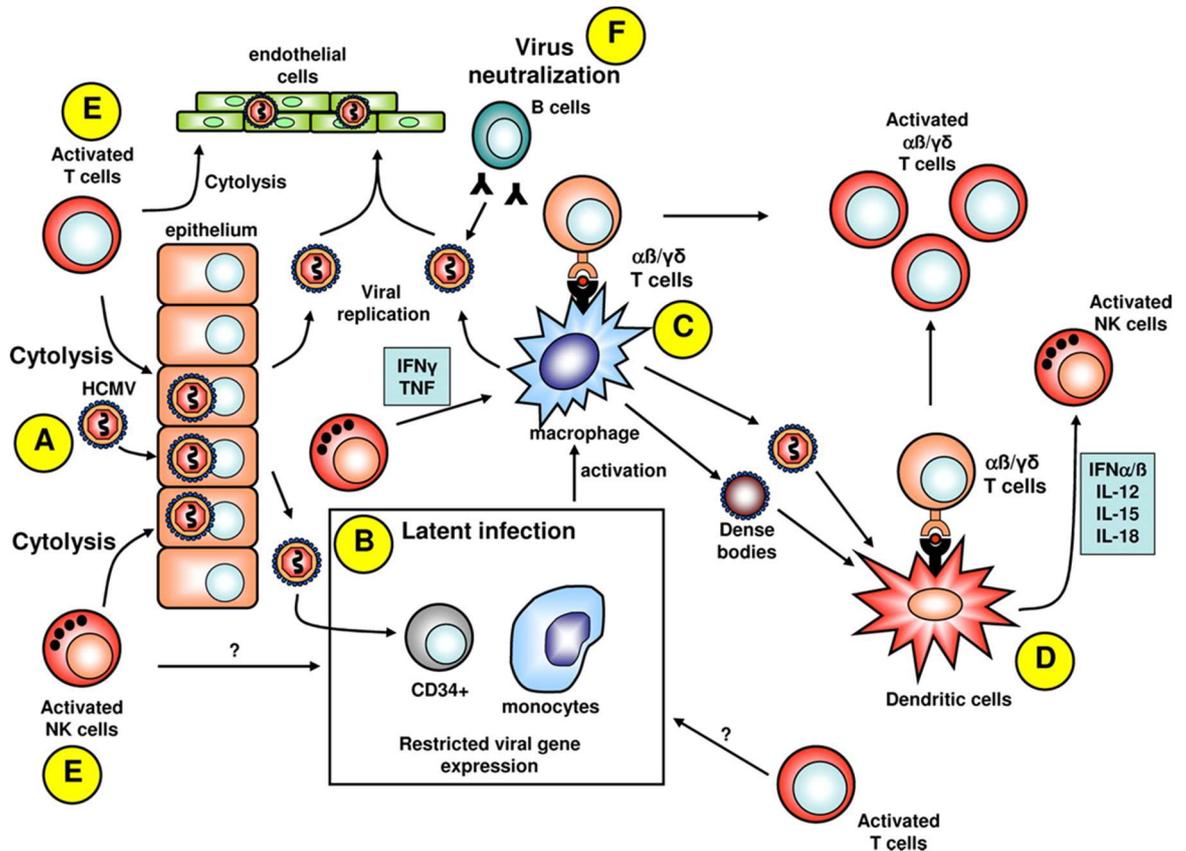


Figure n°13: Contrôle immunitaire du CMVH par l'immunité innée et adaptative. L'infection primaire par le CMVH commence dans les cellules épithéliales (A), ensuite le virus dissémine dans les cellules myéloïdes (monocytes et cellules CD34+), où il entrera en latence (B). La différenciation de ces monocytes infectés en macrophage ou cellule dendritique peut initier l'infection productive (C). Les particules virales ou les corps denses peuvent être présentés par les cellules dendritiques, stimulant alors les cellules T spécifiques de l'antigène. Parallèlement, les DCs activées via les TLR peuvent aussi sécréter un panel de cytokines activant les cellules *Natural Killer* (NK) (D). Les macrophages infectés peuvent aussi activer directement les lymphocytes T spécifiques de l'antigène (C). Ces lymphocytes T activés (CD8, CD4 et $\gamma\delta$) et les cellules NK peuvent directement lyser les cellules infectées par cytolyse ou bloquer la réplication virale au travers de la sécrétion de cytokines telles que l'IFN- γ ou encore le TNF (E). Une autre réponse est médiée par les lymphocytes B activés eux aussi par les cellules présentatrices d'antigènes et qui vont contrôler le virus extracellulaire à l'aide d'anticorps neutralisants (F). (Crough and Khanna, 2009)

2.8 Implication du CMVH dans certains cancers

A *contrario* de certains rétrovirus, le CMVH n'est pas considéré comme un virus oncogène. Cependant, il est détecté dans des tumeurs provenant de différents tissus, dont la glié, la prostate et le colon (Lucas et al., 2011). Lors de son cycle d'infection, le cytomégalovirus humain induit la production de prostaglandine 2 (PGE2) dans les fibroblastes (Speir et al., 1998). La PGE2 est le produit de l'activité de l'enzyme cyclooxygénase (COX) à partir de l'acide arachidonique présent dans les phospholipides cellulaires (Simmons et al., 2004). L'enzyme cyclooxygénase existe sous deux formes: COX-1 qui est l'isoforme constitutif, responsable de la production accrue de prostaglandines, et COX-2 qui est l'isoforme prédominante dans des conditions inflammatoires chroniques. COX-2 est surexprimée dans de nombreux cancers favorisant notamment la croissance tumorale, la survie cellulaire, l'invasivité, l'angiogénèse et l'échappement immunitaire. L'utilisation de traitements antiviraux anti-CMVH tels le ganciclovir permettent de réduire la croissance de cellules de médulloblastome, que ce soit *in vitro*, ou dans des modèles murins de greffes *in vivo* (Baryawno et al., 2011). Fait intéressant, le CMV du macaque Rhésus, RhCMV code un homologue de COX-2 (vCOX-2) nécessaire à sa réplication dans les cellules endothéliales, par inhibition de la production de NO, molécule possédant un effet antiviral. Bien que ne codant pas d'homologue de COX-2, le CMVH augmente la production de cette enzyme dans les cellules infectées, et pourrait utiliser un mécanisme similaire pour favoriser sa réplication (Jarvis and Nelson, 2007).

Parmi les protéines virales potentiellement impliquées dans les processus tumoraux, pUS28 induit l'expression du facteur de croissance VEGF, facteur

important dans l'angiogenèse (Maussang et al., 2009). D'autres médiateurs inflammatoires, telles les cytokines, sont induits par le CMVH, comme l'interleukine IL-6 via sa protéine pUS28. De plus il a été démontré que la protéine IE2 interagit avec la protéine suppressive de tumeur p53, et la kinase virale pUL97 ainsi que pUL82 agissent sur pRB, favorisant ainsi la réplication de l'ADN cellulaire. Les protéines pUL36 et pUL37 du CMVH sont des facteurs anti-apoptotiques, qui peuvent jouer un rôle dans la survie des lignées cancéreuses (Goldmacher, 2005).

3. Transmission du virus

Le CMVH se transmet de manière directe, via les sécrétions corporelles, tels le sperme, les sécrétions cervico-vaginales (voie sexuelle), les larmes, la salive, l'urine, le lait (allaitement), et par le sang ou les tissus infectés. Comme nous l'avons vu précédemment, le virus peut traverser la barrière placentaire pour infecter le fœtus tout au long de la grossesse. Le virus peut également être transmis lors de greffes d'organe ou de moelle (cellules souches hématopoïétiques) si le donneur est séropositif au CMVH. Le CMVH étant associé aux leucocytes sanguins, la transmission transfusionnelle est considérablement réduite par la déleucocytation des culots globulaires.

L'infection périnatale se distingue de l'infection congénitale par son mode d'acquisition et ses conséquences. L'enfant est infecté par les sécrétions cervicales lors de la naissance, ou à distance par le lait maternel, ou par contact avec des personnes excréant du CMVH. L'infection est souvent inapparente, cependant 10% des enfants infectés, notamment en cas de prématurité, développeront des symptômes, principalement des encéphalites, hépatites, pneumonies... (Trincado

and Rawlinson, 2001)., Ce mode d'infection ne génère pas de séquelles malformatives. Nous limiterons notre propos aux mécanismes de l'infection congénitale à CMVH.

4. Epidémiologie de l'infection congénitale

La prévalence mondiale de l'infection congénitale à CMVH est de 0.64%, avec des variations importantes selon les pays. La séroprévalence chez les adultes et l'incidence de l'infection congénitale sont élevées dans les pays en développement (1 à 5% des naissances), principalement des infections maternelles non primaires. En effet, la séroprévalence des mères y est très élevée (plus de 90% au Brésil et en Inde par exemple contre 40 et 50% en France (Cannon et al., 2010)). L'immunité maternelle diffère également selon le contexte socio-économique: en effet, si 90% des femmes des catégories socio-économiques basses ont été infectées par le CMVH, ce taux descend à 50% pour les femmes des catégories socio-économiques supérieures. Cette faible séropositivité augmente le risque d'infection congénitale à CMVH (Basha et al., 2014).

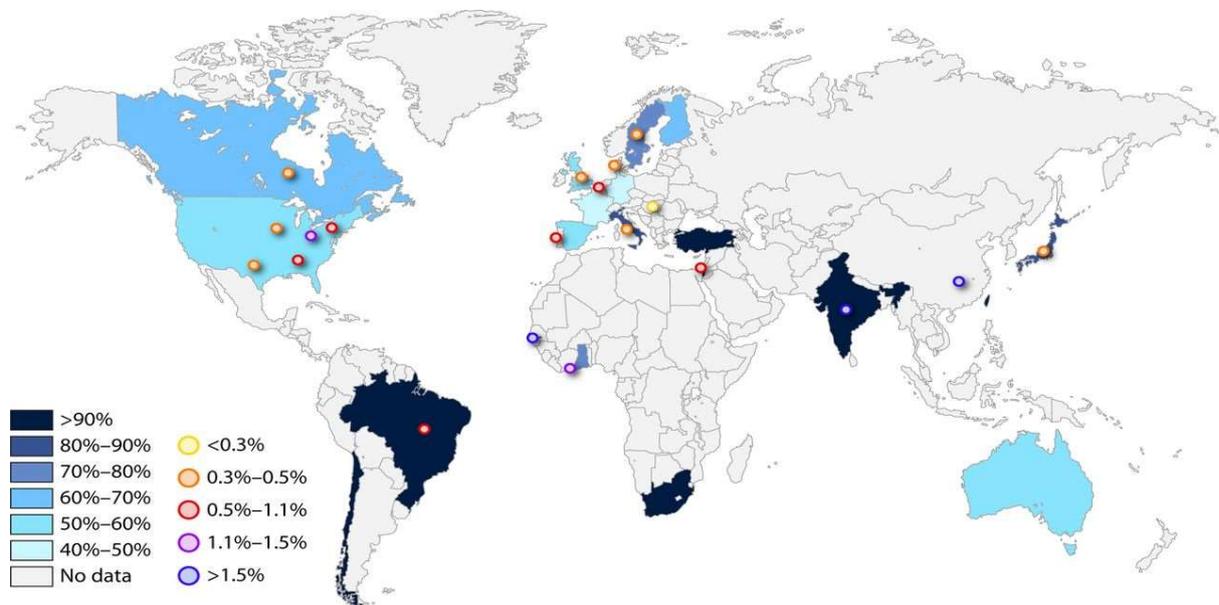


Figure n°14: Séroprévalence du CMV chez les femmes en âge de procréer (rectangles) et prévalence de l'infection congénitale à CMV (cercles). (D'après Cannon et al., 2010)

L'infection du fœtus par le CMV peut survenir tout au long de la grossesse, avec une transmission lors d'une virémie maternelle, par les leucocytes via le placenta. Le risque de transmission est de 30 à 50% au cours des primo-infections maternelles, et de 1 à 3% lors des infections secondaires, réinfections ou réactivations. Le CMV peut se répliquer dans les fibroblastes placentaires, les syncytiotrophoblastes et les cytotrophoblastes par lesquels le virus peut infecter le fœtus par le cordon ombilical. Si l'infection se déroule pendant les 16 premières semaines de grossesse, l'incidence des dommages fœtaux est plus élevée.

4.1 Manifestations cliniques chez le fœtus

Environ 12% des enfants nés avec une infection virale à CMV sont symptomatiques. Les symptômes présentés sont variés: ictère, hépatomégalie, retard staturo-pondéral, calcifications intracérébrales, microcéphalie (Naing et al., 2015). Parmi ces enfants, 4% décéderont de cette infection, et entre 45-60% développeront des séquelles permanentes (perte d'audition, problèmes visuels et

déficience cognitive). Cependant, environ 40% resteront sans séquelle. A l'inverse, parmi les enfants nés asymptomatiques, 13,5 % vont développer les symptômes de l'infection congénitale à CMV, et les séquelles seront aussi permanentes (Manicklal et al., 2013). Le syndrome est souvent sous-estimé car la détection de l'infection est plus tardive.

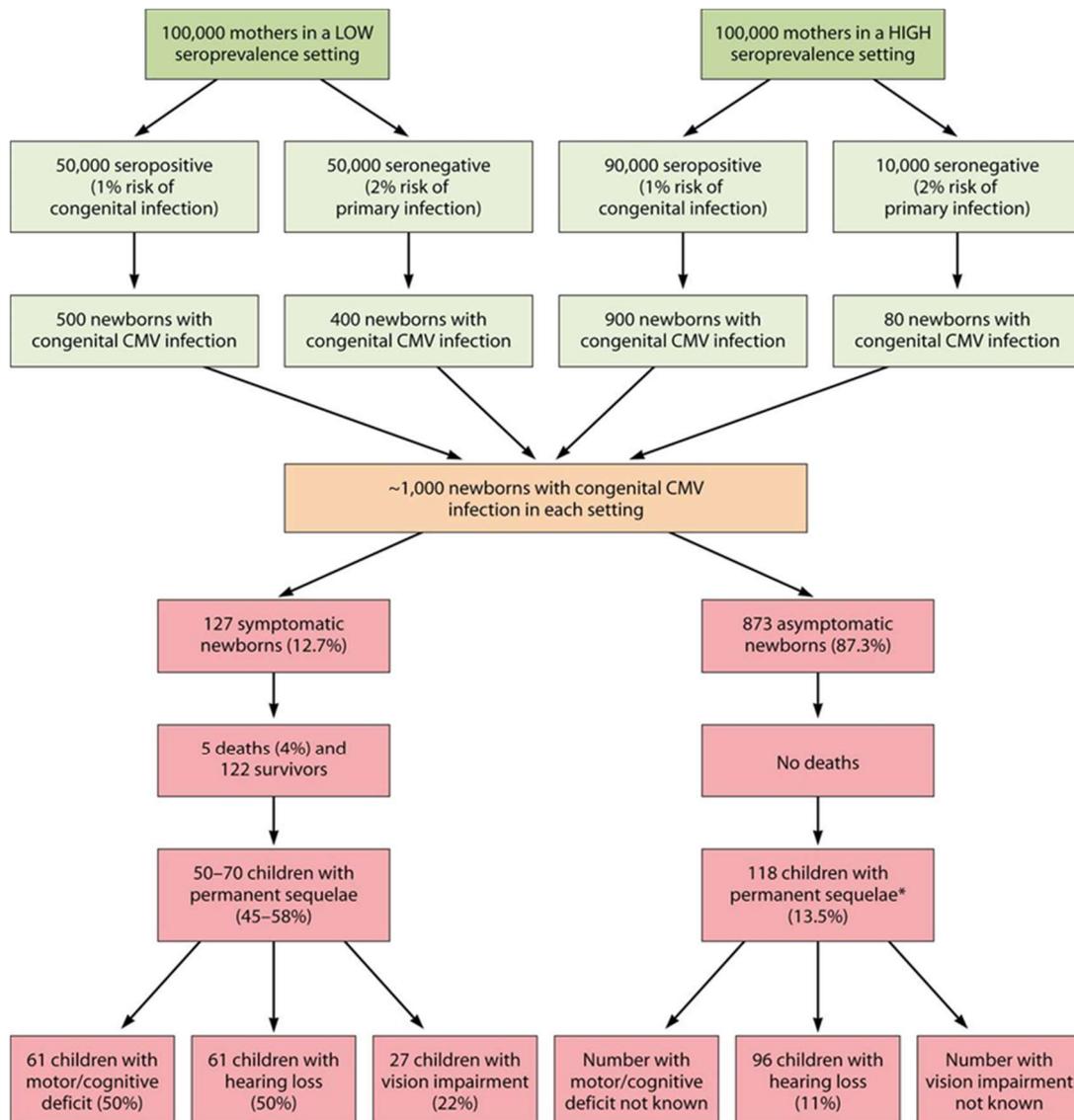


Figure n°15: Schéma détaillant les risques de développement d'un CMVH congénital, selon la prévalence de l'infection à CMV chez les jeunes femmes. (Manicklal et al., 2013)

Dans les pays développés, le CMVH est impliqué dans 21 et 24% des pertes d'audition à la naissance et à l'âge de 4 ans. Le risque de complications à long terme est plus grand chez les enfants dont la mère a eu une primo-infection durant la première moitié de la grossesse. En effet, un quart des enfants infectés durant le premier trimestre de grossesse vont développer une perte d'audition et 30 à 35% d'entre eux vont développer des séquelles du système nerveux central (Manicklal et al., 2013).

On estime qu'environ la moitié des femmes en âge de procréer sont séronégatives dans les pays industrialisés; le CMVH est alors contracté lors de contacts prolongés avec des enfants en bas âge. *A contrario*, dans les populations plus défavorisées, le CMVH est contracté très tôt dans l'enfance, donc la séroprévalence maternelle est élevée.

4. 2 Impact des infections concomitantes sur l'infection congénitale à CMVH:

4.2.1 Infection par le VIH:

Les femmes infectées par le VIH ont un risque accru de réactivation du CMVH. Le risque d'un CMVH congénital est plus élevé chez les enfants infectés par le VIH (10.3% contre 2.2% chez les enfants non infectés), et la fréquence des symptômes est également plus élevée (23% d'enfants symptomatiques contre 6.7 %) (Guibert et al., 2009).

4.2.2 Infections bactériennes placentaires:

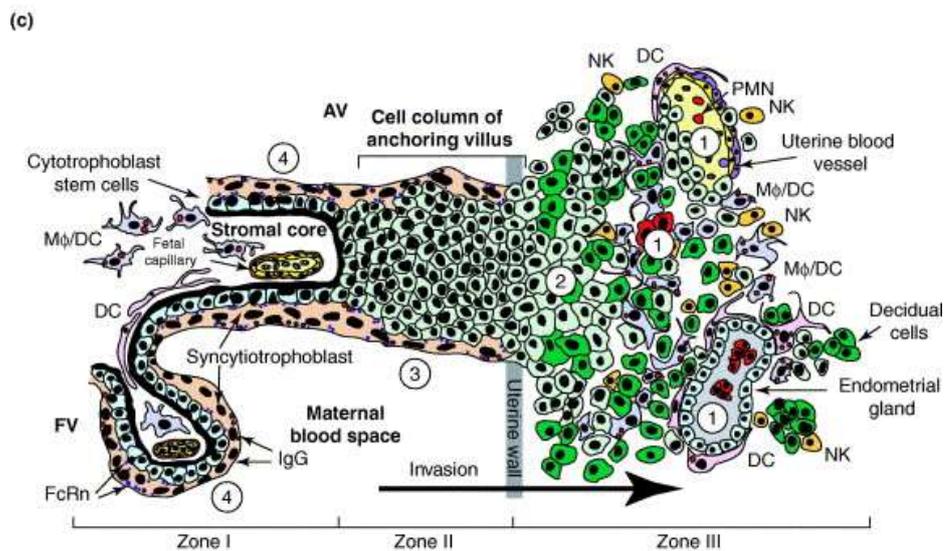
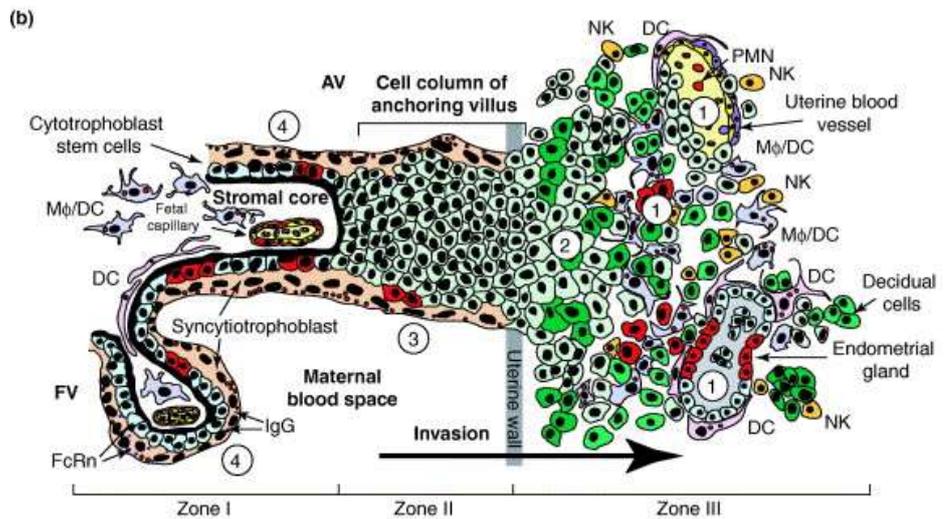
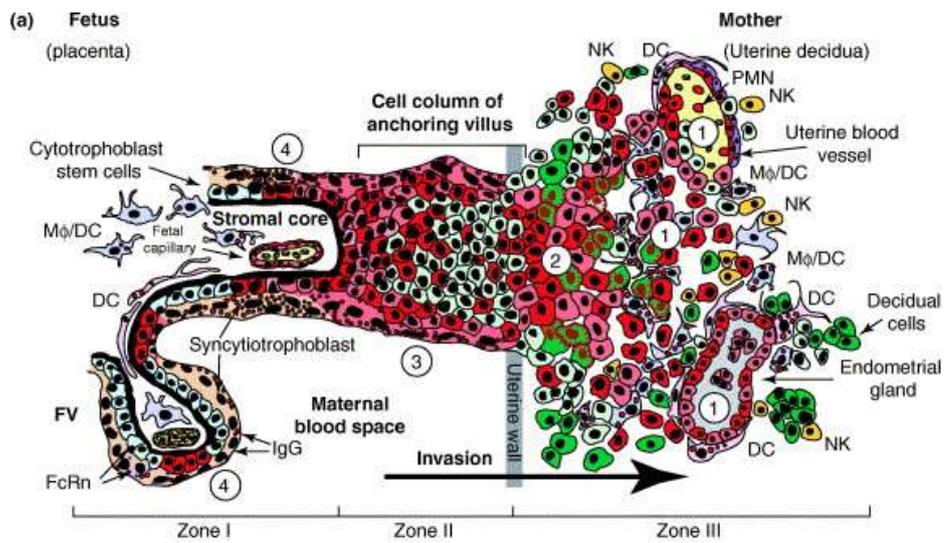
Une étude menée par Mc Donagh et al sur des biopsies placentaires et déciduales du premier et second trimestre de grossesse conforte l'hypothèse d'une

réactivation du CMV dans les cellules infectées suite à un état inflammatoire induit par des espèces bactériennes pathogènes. En effet, si le virus est peu détecté dans les placentas provenant de femmes ayant eu une infection à CMVH ancienne, la détection du virus dans certaines cellules de la décidua ainsi que dans les syncytiotrophoblastes, est associée à la détection d'une infection récente ou primaire à CMVH ainsi qu'à la présence de diverses bactéries pathogènes, dont *Chlamydia spp*, suggérant une réactivation virale. Cependant, le type de cellules infectées est moins varié que dans le cas d'une infection primaire à CMVH en absence d'infection bactérienne, suggérant une protection locale des effecteurs de l'immunité humorale (McDonagh et al., 2004).

5. Mécanisme de l'infection du placenta par le CMVH

Dans la littérature, trois modèles d'infection sont décrits à l'interface materno-fœtale et détaillés dans la figure n°16 (Pereira et al., 2005):

1. Les cellules de la décidua et du placenta sont fortement infectées mais le titre en anticorps anti-CMVH de la mère est faible.
2. Peu de cellules déciduales sont infectées et on retrouve quelques foyers infectieux dans le placenta.
3. Seules des cellules dans le placenta sont infectées.



TRENDS in Microbiology

Figure n°16: représentation schématique des modèles d'infection du CMVH à la surface materno-fœtale. (a) Infection de la décidua associée à un placenta infecté. Les cellules infectées (en rouge) et les vésicules contenant la gB (en rouge) dans les macrophages (M ϕ) et les cellules dendritiques (DCs) se situent dans l'interface. Les foyers de cellules infectées se trouvent dans les glandes de l'endomètre; les vaisseaux sanguins utérins et les cytotrophoblastes invasifs. Le CMVH est transmis de la décidua au placenta adjacent. Certains M ϕ /DCs contiennent des vésicules avec des protéines virales, suggérant une phagocytose sans infection. (b) Infection déciduale limitée et infection focalisée dans les cellules progénitrices des trophoblastes et phagocytose des virions par les M ϕ et DCs villositaires. (c) Infection déciduale et placentaire réduite à la présence de protéines virales dans le syncytiotrophoblaste et dans les M ϕ et DCs sans réplication. Abréviations: AV, villosité d'ancrage; FcRn, Récepteur néonatal Fc; FV, villosité flottante; IgG, immunoglobuline G; NK, *natural killer*; PMN, neutrophile. Les sites proposés comme voies d'infection par le CMVH *in utero* sont numérotés de 1 à 4. (Pereira et al., 2005)

5.1 Cellules impliquées dans la transmission du virus

L'infection *in vitro* requiert l'adhésion de lymphocytes infectés à la surface des trophoblastes, les surfaces cellulaires devant être proches sans pour autant fusionner. Il a été démontré qu'*in vitro* et *ex vivo*, les cytotrophoblastes sont permissifs à l'infection par le CMVH (Fisher et al., 2000).

Des modèles *in vitro* ont permis l'identification des cellules capables de transmettre le CMVH dans les vaisseaux sanguins de l'utérus à l'interface materno-fœtale, et ont montré que les utMVEC polarisées, qui sont des cellules impliquées dans la micro vascularisation utérine, sont extrêmement permissives au niveau apical, mais pas au niveau basal, et ce, plus que les HUVEC. L'infection à CMVH va

rompre les jonctions adhérentes entre ces cellules, qui vont ensuite transmettre l'infection à CMVH aux cytotrophoblastes différenciés.

Les neutrophiles infectieux peuvent transmettre le virus aux utMVEC, par transmigration depuis la surface apicale à travers la barrière endothéliale. Il est intéressant de noter que les utMVEC peuvent infecter directement les cytotrophoblastes, alors que les neutrophiles ne le peuvent pas, et que les anticorps neutralisant le CMVH peuvent moduler l'infection aux cytotrophoblastes endovasculaires. La transmission du CMVH peut également se faire par le relargage du virus depuis l'endothélium infecté à l'interface materno-foétale.

L'interface entre les cytotrophoblastes invasifs et les cellules endothéliales dans les vaisseaux utérins remodelés quand les cytotrophoblastes remplacent le lumen endothélial et les cellules musculaires peut être un locus idéal pour la réplication du CMVH (Pereira et al., 2005). Les protéines virales sont détectées dans l'épithélium des glandes endométriales (décidua) et les cytotrophoblastes des villosités libres et d'ancrage. Les macrophages et cellules dendritiques contiennent des virions phagocytés. L'étude de l'infection d'explants *in vitro* montre que les cytotrophoblastes sous les syncytiotrophoblastes expriment des protéines virales.

Pour conclure, trois voies d'infection sont possibles: la première se fait par la dissémination directe des cellules du sang maternel aux cytotrophoblastes présents dans les villosités flottantes. La seconde se fait via des macrophages infectés par le CMVH aux cytotrophoblastes invasifs ou en voie de différenciation dans la décidua. La dernière s'effectue via les cellules infectieuses dans le sang maternel aux cellules endothéliales et aux cytotrophoblastes endovasculaires.

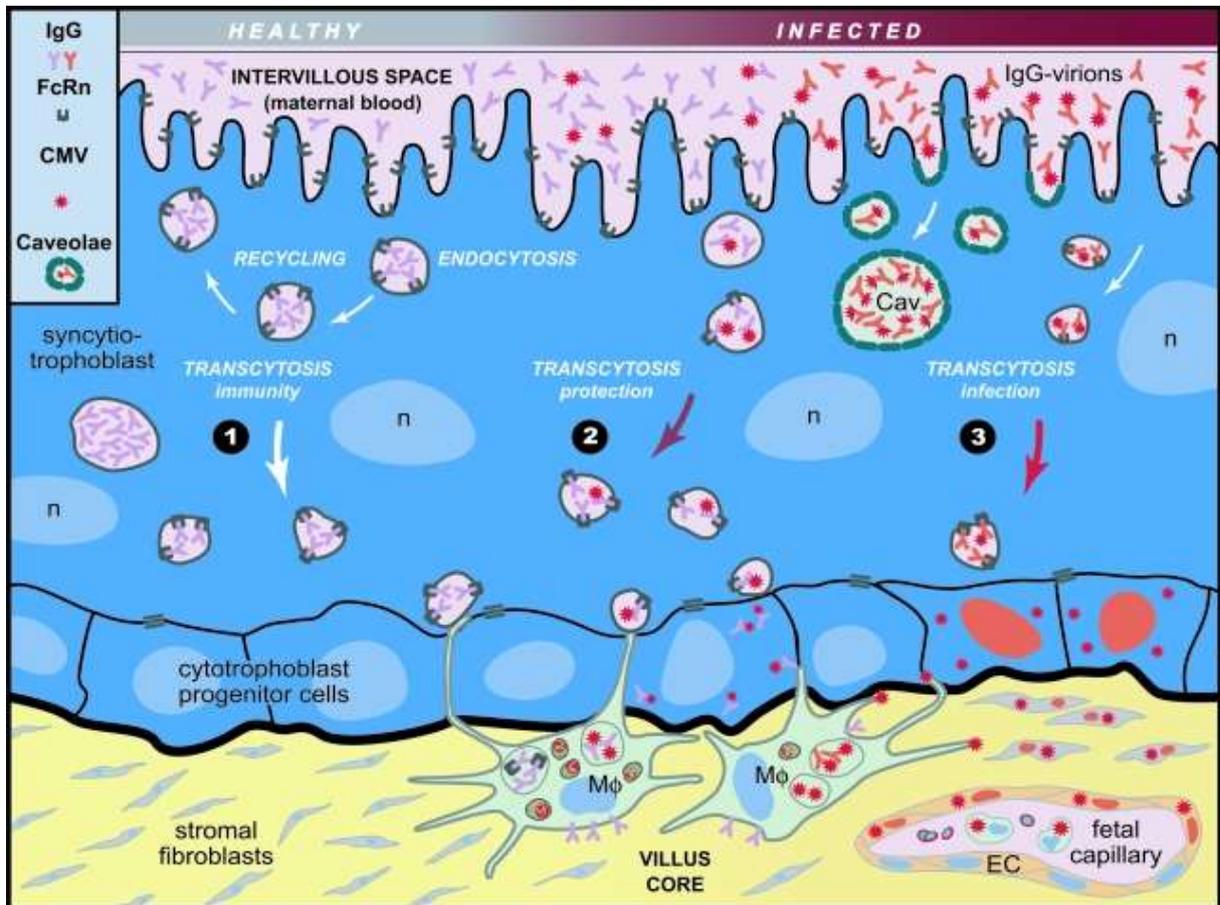


Figure n°17 : Schéma de la transmission du CMV dans les villosités chorioniques flottantes. **Voie 1** : Dans le syncytiotrophoblaste non infecté, les IgG du sang maternel sont absorbés par pinocytose en se fixant sur les récepteurs FcRn. Les endosomes sont alors recyclés ou traversent le syncytium vers la membrane basale par transcytose. **Voie 2** : suppression de l'infection lorsque le complexe est fortement neutralisant à faible pH dans les vésicules d'endocytose. Les complexes IgG-gB sont stockés dans des cavéosomes à pH neutre (Cav). Les complexes virions-IgG sont alors amenés par transcytose au travers du syncytiotrophoblaste et capturés par les macrophages villositaires (M) après avoir été internalisés dans le cytotrophoblaste. **Voie 3** : Infection focale du cytotrophoblaste par les complexes IgG-virions avec une faible activité neutralisante. L'infection peut alors se propager vers les fibroblastes du stroma, les vaisseaux sanguins, les leucocytes et l'intérieur des villosités. En rouge sont représentés les noyaux des cellules infectées (Maidji et al., 2006).

5.2 Impact de l'infection à CMV sur la structure du placenta

Le CMV va induire une inflammation du tissu conjonctif villositaire, appelée villite. L'observation au microscope des cellules placentaires montre la présence d'un aspect en «œil de hibou» caractéristique de l'infection à CMV. Au niveau du

chorion, le CMVH peut infecter les cellules progénitrices des trophoblastes et empêche la formation des villosités chorioniques (Tabata et al., 2015).

Le CMVH va également impacter l'angiogenèse et la vascularisation du placenta. L'étude menée par Tabata dans un modèle de greffe dans la souris montre que l'infection du greffon par la souche VR1814 change la formation des villosités d'ancrage, dont les colonnes sont plus grêles, constituées de cytotrophoblastes individuels. A noter que l'impact sur la formation des villosités diffère selon la souche virale utilisée. En effet, on observe moins de différences entre les greffons non infectés et les greffons infectés par la souche de laboratoire AD169 qu'avec la souche VR1814 (Tabata et al., 2012).

Par ailleurs, l'étude de placentas issus de grossesses présentant une infection congénitale à CMVH montre la présence de phénomènes d'hypoxie avec des villosités non vascularisées, et des niveaux élevés de VEGF-A et de son récepteur Flt-1 dans le liquide amniotique (Tabata et al., 2012). D'autres défauts fonctionnels sont observés au niveau cellulaire, dus probablement à des phénomènes inflammatoires.

5.3 Cytokines, chimiokines, enzymes

En infectant le placenta, le CMVH induit l'augmentation de l'expression de cytokines pro-inflammatoires telles MCP-1 et TNF- α , l'expression de la chimiokine MCP-1 étant associée à la mort du fœtus (Hamilton et al., 2012). L'infection à CMVH change la balance immunitaire Th1/Th2 en altérant l'expression des cytokines dans les cellules placentaires, et en augmentant l'expression des cytokines Th1 dans le

liquide amniotique telles TNF- α , IL-1 β , IL-12 et IL-17. Kovacs et al ont démontré que l'infection des syncytiotrophoblastes par le CMVH augmentait de façon significative la production de cytokines inflammatoires comme IL-6 et IL-8 (Kovács et al., 2007).

Une étude menée par Scott et al. en 2012 sur des échantillons de liquide amniotique de femmes infectées par le CMVH montre une augmentation significative des cytokines TNF-alpha, IL10, IL-12, IL-15 et IL-17, ainsi que des chimiokines CCL2, CCL4 et CXCL10 pendant le deuxième trimestre de grossesse (Scott et al., 2012).

Il a été montré que le virus augmentait la production de la leucotriène B4 (Benard et al., 2014) possédant des propriétés inflammatoires, ainsi que de la 5-lipoxygénase, qui est l'enzyme catalysant cette leucotriène à partir de l'acide arachidonique. L'expression de l'indoléamine 2,3-dioxygénase (IDO), qui permet d'éviter le rejet de l'embryon par la mère, est diminuée par l'infection à CMVH, notamment dans des placentas précoces (obtenus entre 8 et 11 semaines d'aménorrhée) (Lopez et al., 2011).

5.4 Impact de l'infection à CMVH sur l'expression de facteurs de croissance

Les facteurs de croissance, impliqués dans la vascularisation du placenta, sont également impactés par l'infection à CMVH: l'étude menée *ex vivo* par Tabata montre que les facteurs VEGF-A, VEGF-C, SVEGFR-3 et bFGF augmentent lors de l'infection virale. Ces facteurs stimulent la prolifération des cellules endothéliales lymphatiques, l'infection à CMVH induit donc une prolifération anormale de ces cellules. Cette étude a également démontré que le CMVH réduit drastiquement

l'invasion endovasculaire des cytotrophoblastes impliqués dans la formation de la vascularisation placentaire, amenant à la formation de vaisseaux chimériques atrophiés (Tabata et al., 2012). L'expression des facteurs de croissance GM-CSF et PDGF-bb est également augmentée (Scott et al., 2012).

L'impact sur l'expression de ces facteurs varie également selon la souche virale utilisée; l'effet est plus prononcé avec la souche VR1814, proche génétiquement des souches cliniques, qu'avec la souche de laboratoire AD169 (Tabata et al., 2012).

6. Réponse immunitaire maternelle à l'infection à CMVH

La réponse immunitaire anti-HCMV est détectable dès la 22^{ème} semaine de grossesse. On distingue deux types de réponse immunitaire face à une infection par un pathogène: la réponse immunitaire innée et la réponse immunitaire acquise. Si le système immunitaire peut réguler l'infection à CMVH, certains effecteurs semblent paradoxalement être impliqués dans la transmission *in utero* du CMVH (voir figures n°19 et 20).

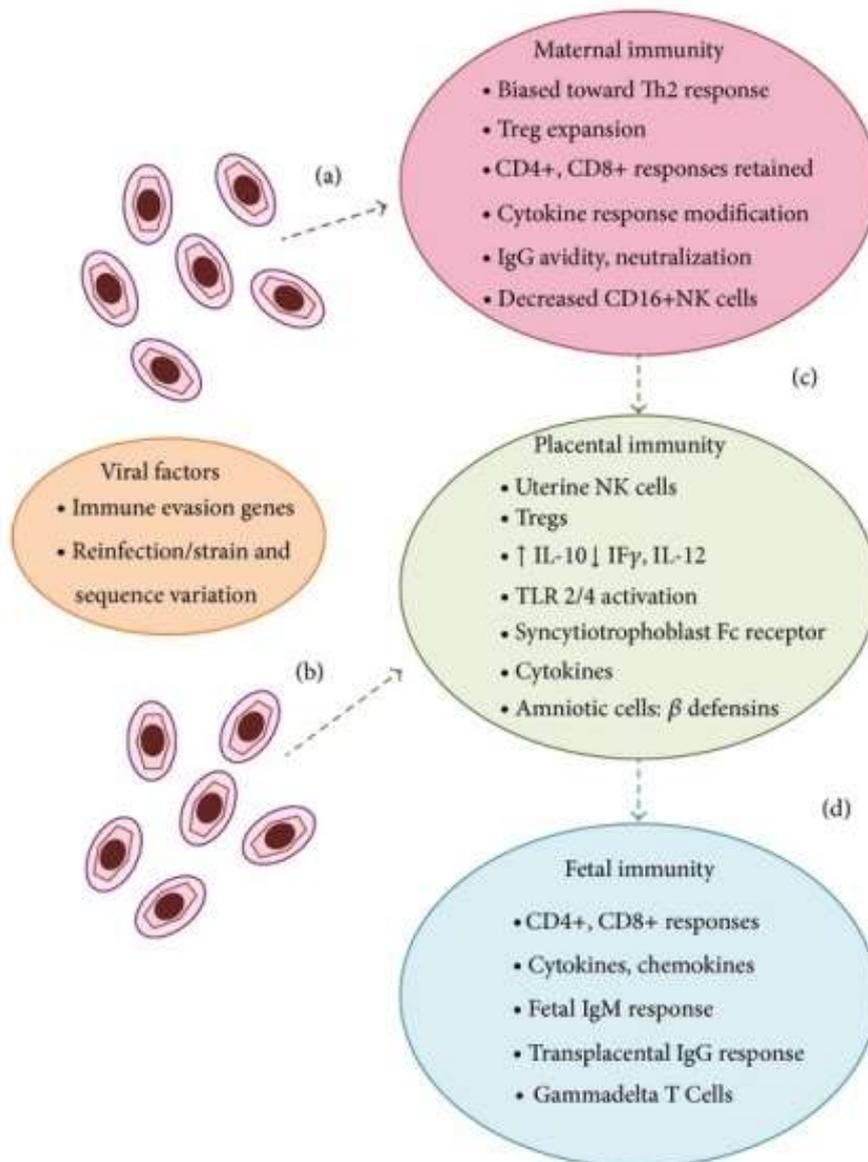


Figure n°18: représentation schématique des voies de transmission du CMV au fœtus et des réponses immunitaires potentiellement importantes dans prévention de la transmission et de l'infection foetale. Le CMVH peut atteindre le placenta via le compartiment maternel (a) ou remonter via le tractus reproducteur (b) et impacter les différentes immunités, maternelle, placentaire ou fœtale (Schleiss, 2013).

6.1 Immunité innée

L'immunité innée joue probablement un rôle crucial dans la prévention de l'acquisition des infections à CMVH congénitales et périnatales; cependant, en fonction de facteurs génétiques, de l'état de tolérance immunitaire de la grossesse, de l'évasion immunitaire virale, les effecteurs de l'immunité innée peuvent contribuer à un risque accru de contracter l'infection (figure n°19).

TABLE 1: Summary of innate immune responses and their proposed role in control of or susceptibility to congenital CMV infection.

Innate immunity and susceptibility/protection in congenital CMV infection		
Immune effector	Maternal/placental/fetal compartment	Proposed effect on CMV transmission/disease
NK cells-CD56 ^{bright}	Maternal (pregnancy) Uterine NK cells	(i) Decreased cytolytic potential (ii) Increased risk of CMV transmission?
NK cells-NKG2C+	Fetal compartment	(i) Expansion of this NK subset in congenital and perinatal CMV (ii) Correlation with symptomatic CMV disease?
Phagocytic cells	Placental compartment	(i) Neutrophils: possible role in defense (ii) Macrophage: potentiates spread to syncytiotrophoblasts?
Toll-like receptors	Maternal compartment Placental compartment	(i) TLR2 polymorphism; ↓ signaling to CMV glycoproteins; ↑ risk of CMV disease in transplant patients; increased transmission risk? (ii) TLR3 polymorphism; decreased signaling to CMV antigens (iii) TLR7 polymorphism: decreased antibody response to glycoprotein B?
Cytokines Chemokines Defensins	Neonatal compartment Maternal compartment Placental compartment Placental-fetal interface	(i) ↑ IL-8 ↓ IF- γ may correlate with increased transmission risk (ii) Increased maternal CCL-10 correlates with transmission (iii) Increased placental MCP-1 expression correlates with fetal demise (iv) Physiological increase in uterine IL-10 in pregnancy: increased risk of reactivation/transmission? (v) Beta-defensins 8 and 31 proposed to be upregulated in amniotic fluid of asymptotically congenitally infected infants

Figure n°19: Tableau résumant les effecteurs de l'immunité innée et leur rôle présumé dans le contrôle ou la susceptibilité face à l'infection congénitale à CMVH. (Schleiss, 2013)

6.1.1 Les Toll-like receptors (TLRs)

Les *Toll-like receptor* (TLR) sont une famille de récepteurs reconnaissant les pathogènes et enclenchant la réponse immunitaire innée contre ces pathogènes. Les glycoprotéines d'enveloppe gB et gH activent le TLR2 *in vitro* (Boehme et al., 2006).

D'autres TLRs sont impliqués dans la réponse à l'infection à CMVH: en effet, une étude de 2007 portant sur des explants cervicaux et des cultures cellulaires de

fibroblastes montre que des ligands pour TLR 2, 3, 4 et 9 permettent l'inhibition de l'infection dans les explants cervicaux, tandis que dans les cultures fibroblastiques, seuls les ligands pour TLR 3 et 4 permettent l'inhibition de l'infection à CMVH. En effet, les deux tissus expriment des TLRs différents (Harwani et al., 2007).

6.1.2 Les cellules NK

Les cellules NK sont des effecteurs importants de l'immunité innée impliqués dans le contrôle de l'infection virale. En effet, les cellules NK lysent les cellules infectées-cible par le biais du système perforine/granzyme. Ces cellules produisent également des cytokines pour moduler les réponses immunitaires adaptatives en interagissant avec des cellules dendritiques. Nous avons vu précédemment que des NK particulières se trouvent dans la décidua. Bien que ces cellules NK diffèrent des cellules NK périphériques, elles possèdent une capacité cytotoxique similaire à la sous population des NK CD56 (Lash et al., 2010).

Ceci fait partie des différents mécanismes impliqués dans la tolérance immunitaire nécessaire à l'état de grossesse. Ces cellules produisent diverses cytokines dont notamment l'IFN- γ qui participe à l'immunité innée et à la défense contre les pathogènes (Strowig et al., 2008). Par conséquent, le potentiel cytotoxique de ces cellules suite à une exposition au virus peut être important dans la prévention de la transmission du CMV en début de grossesse (Le Bouteiller et al., 2011).

6.1.3 Les cellules phagocytaires (neutrophiles et macrophages)

Le rôle des cellules phagocytaires dans la protection contre l'infection congénitale est peu renseigné. Les neutrophiles semblent être la première ligne de défense contre la transmission verticale du CMVH. Une étude menée par McDonagh et al. sur des placentas infectés montre la présence de neutrophiles infiltrant les villosités (McDonagh et al., 2006). Il est intéressant de noter que les infiltrations de neutrophiles sont associées à une charge virale élevée, tandis que les macrophages et cellules dendritiques sont observés à de niveaux plus faibles de charge virale. Une autre étude menée dans un modèle *ex-vivo* placentaire a montré que les macrophages peuvent également être la cible de l'infection à CMVH et peuvent être à l'origine de la propagation du virus aux syncytiotrophoblastes (Weisblum et al., 2011).

6.1.4 Cytokines, chimiokines, enzymes

Les cytokines semblent être des effecteurs importants dans le contrôle immunitaire de l'infection à CMVH. Une grossesse qui se déroule normalement est associée à une production croissante de la cytokine anti-inflammatoire IL-10 au fil des trimestres et un profil orienté Th2 afin de permettre la tolérance vis-à-vis du fœtus. (Roth et al., 1996). Nous avons vu précédemment que l'infection à CMVH impacte la production de diverses cytokines; cependant, ces cytokines n'ont pas forcément un effet protecteur, en effet, certaines d'entre elles, dont IL-8 et IL-10, semblent accroître le risque de transmission du virus.

6.2 Immunité acquise

L'immunité acquise dans le contexte de l'infection congénitale à CMV et périnatale a clairement été plus largement évaluée que l'immunité innée. Un certain nombre d'études ont tenté d'élucider le rôle des anticorps en tant que protection contre la transmission congénitale à CMVH et, paradoxalement, en tant que promoteurs de la transmission du virus aux syncytiotrophoblastes (figure n°20).

TABLE 2: Summary of adaptive immune responses and their proposed role in control of or susceptibility to congenital CMV infection.

Adaptive immunity and susceptibility/protection in congenital CMV infection		
Immune effector	Maternal/placental/fetal compartment	Proposed effect on CMV transmission/disease
CD4+ T cells	Maternal compartment Fetal/neonatal compartment	(i) Delayed development of CD4+ T-cell lymphoproliferative response correlates with maternal-fetal transmission (ii) Defective CD4+ immunity; diminished IF- γ and IL-2 production in fetal and early childhood infection (iii) Defective fetal CD4+ response may contribute to congenital CMV infection and disease
T-regs	Maternal compartment	(i) Treg expansion: normal response to pregnancy (ii) \downarrow Tregs: correlates with protection against CMV disease in transplant recipients (iii) Relevance to congenital CMV unknown
CD8+ T cells	Maternal compartment Fetal/neonatal compartment	(i) CD8+ response to infection appears unaltered in pregnancy (ii) Fetal CD8+ response to CMV antigens noted as early as week 22 gestation (iii) Exhibit cytolytic properties and elucidate IF- γ (iv) Some studies raise questions about functionality?
Gammadelta T cells	Neonatal compartment	(i) Fetal gammadelta T cells differentiate and expand in setting of congenital CMV infection (ii) Produce IF- γ and other cytokines (iii) Role in protection of fetus, control of virus not clear
Antibody	Maternal compartment Placental compartment Fetal compartment	(i) Variability in maternal antibody response based on viral strain variation, possibly TLR polymorphisms (ii) Expression of neonatal Fc receptor may paradoxically promote transcytosis of CMV particles across syncytiotrophoblast by low-avidity antibody (iii) High avidity antibody may neutralize CMV at placental interface (iv) Transplacental transfer of therapeutic neutralizing antibody may improve outcome of infected fetus

Figure n°20: Tableau résumant les effecteurs de l'immunité acquise dans les compartiments materno-fœtaux, et leur rôle présumé dans le contrôle ou la susceptibilité face à l'infection congénitale à CMVH (Schleiss, 2013).

6.2.1 Cellules T CD4+

L'ampleur de la réponse des cellules T CD4 + de la mère à l'infection par le CMVH semble jouer un rôle important dans la prédiction de la transmission au fœtus.

La réponse CD4 au CMVH est précoce, orientée Th1 et impliquée dans la mise en place et le maintien de la réponse CD8.

Les glycoprotéines virales gB et gH, la protéine de tégument pp65 mais également les protéines non structurales IE sont des cibles majeures de la réponse CD4. Il a été démontré que la grossesse n'influence pas la réponse immunitaire CD4+ spécifique au CMVH (Revello et al., 2006). Une étude menée sur des femmes enceintes et non-enceintes, dont 8 séropositives pour le CMVH, a examiné la proportion de cellules CD4+ spécifiques du CMVH dans les lymphocytes du sang périphérique (Fujikawa et al., 2003). Si la proportion de ces CD4+ ne varie pas entre les femmes enceintes quel que soit le trimestre, elle augmente chez les femmes enceintes chez qui l'infection à CMVH se réactive. L'absence d'infection congénitale après ces grossesses tend à prouver que la réponse de ces CD4+ peut partiellement contribuer à la prévention de la transmission intra-utérine dans le cadre de réactivation ou de réinfection.

Il existe un sous-ensemble de cellules CD4+ connus sous le nom de lymphocytes T régulateurs (Treg). Ces cellules sont impliquées dans le maintien de la grossesse et la tolérance du système maternel au fœtus. Cependant, les Tregs peuvent bloquer les réponses immunitaires antivirales. Le rôle que jouent les Tregs dans la susceptibilité ou la protection contre l'infection fœtale à CMVH n'a pas été étudié (Schleiss, 2013).

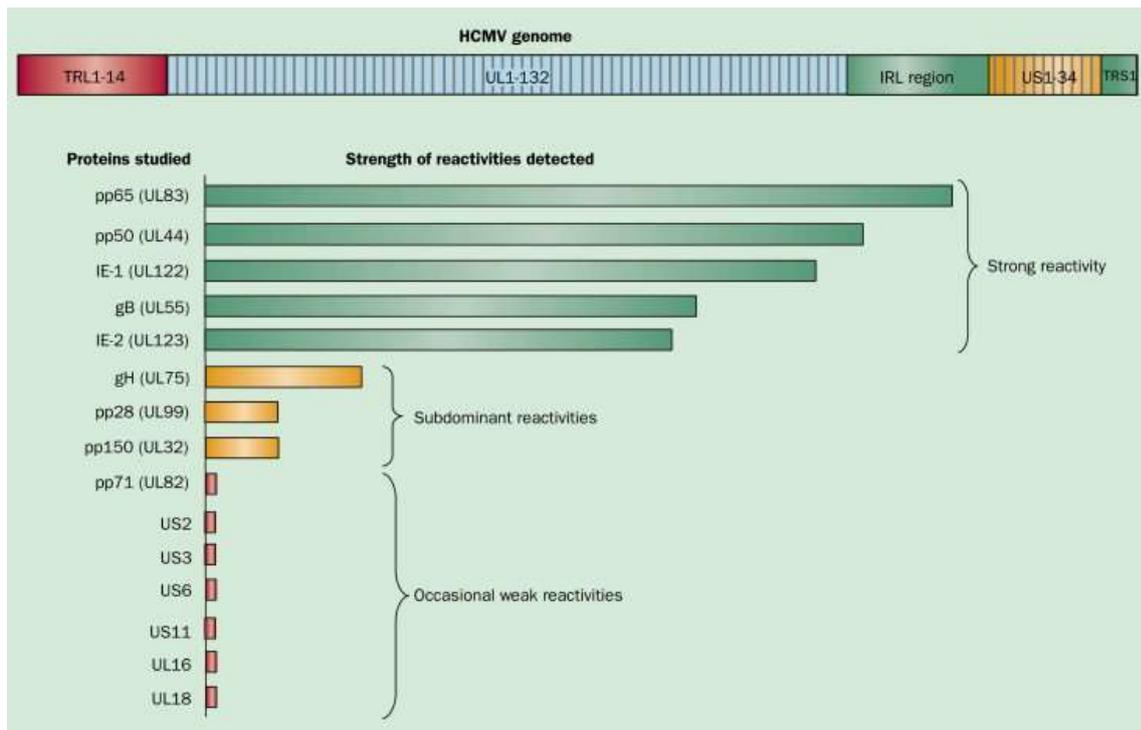


Figure n°21: Schéma récapitulant la force des réponses CD4+ et CD8+ face aux protéines virales. (Gandhi and Khanna, 2004)

6.2.2 Cellules T CD8+

La primo-infection par le CMVH chez les hôtes immunocompétents induit l'activation et la différenciation des cellules T naïves CD8+, qui deviennent des cellules effectrices / mémoires capables de sécréter l'IFN- γ et de lyser des cellules cibles infectées. La réponse CD8+ peut apparaître dès la 22^{ème} semaine de grossesse. Les antigènes qui induisent le plus la réponse CD8+ sont pUL123 (IE-1), pUL122 (IE-2) et pUL83 (pp65) (Crough and Khanna, 2009).

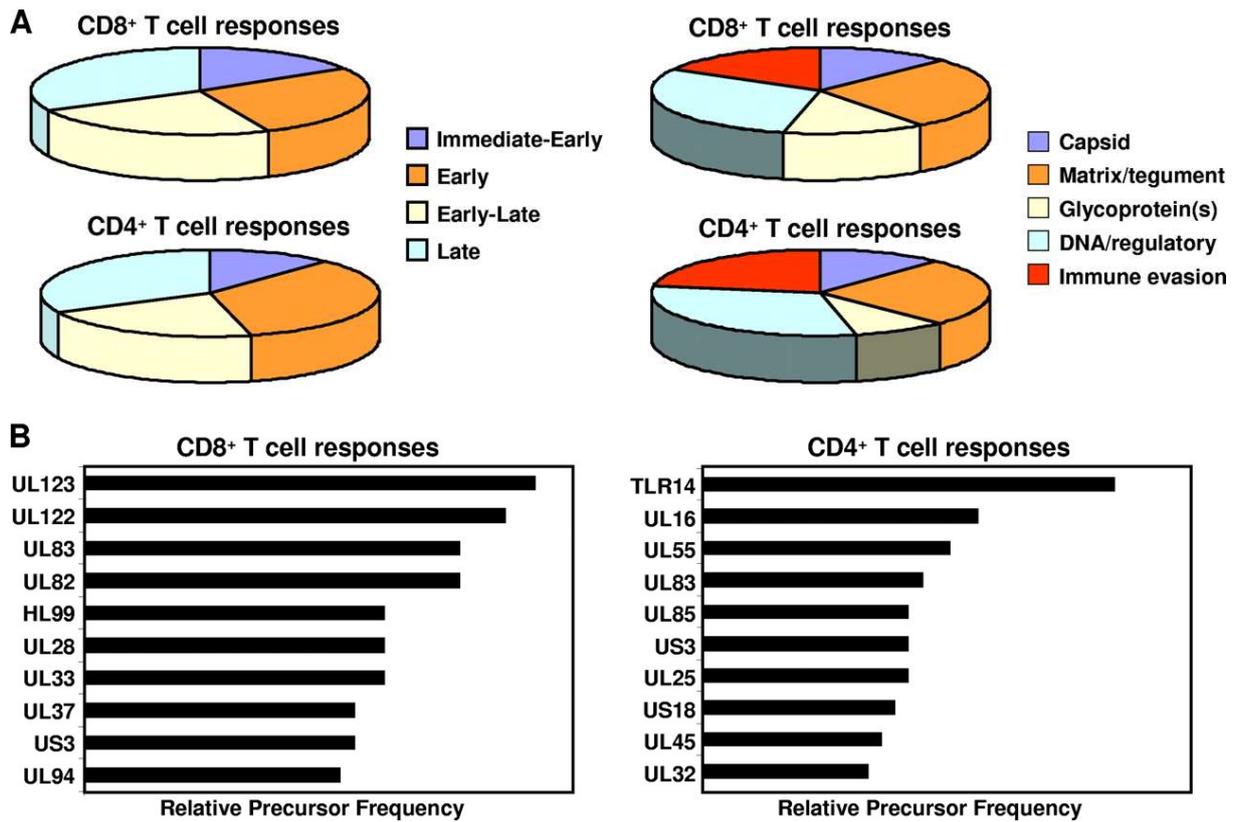


Figure n°22 : schéma représentant la proportion de réponse CD4+ et CD8+ selon les protéines virales (Crough and Khanna, 2009).

Comme pour les cellules CD4+, la grossesse ne semble pas avoir un impact sur la formation des CD8+. Le développement des réponses CD8+ dans le cadre d'une infection par le CMV périnatale / congénitale a été examiné par un certain nombre de groupes. Une étude a été menée par Pédrón et al sur 16 mères ayant fait une séroconversion au cours du premier trimestre de la grossesse et dont le fœtus était infecté. Les échantillons, recueillis entre la 22 et la 39^{ème} semaine de gestation, ont montré des réponses similaires chez les mères et les foetus, bien que le pool de CD8+ spécifiques du pp65 et la sécrétion d'IFN- γ soient plus faibles chez le fœtus (Pédrón et al., 2007).

Bien que cette étude ne montre pas de protection des CD8+ contre l'infection à CMVH foétale, une autre étude menée par Marchant et al sur des nourrissons infectés congénitalement a démontré que la réponse CD8+ est similaire à celle détectée chez l'adulte. Ces cellules ont une activité cytolytique forte dépendant de la perforine et produisent des quantités abondantes de cytokines antivirales, en particulier IFN- γ (Marchant et al., 2003). D'autres études sont nécessaires pour définir clairement le rôle des cellules CD8+ produites à la fois dans les compartiments maternel et foetal dans la protection contre l'infection congénitale à CMVH.

6.2.3 Cellules T $\gamma\delta$

Les cellules T $\gamma\delta$ sont des cellules T non conventionnelles qui ne nécessitent pas de présentation de l'antigène par le CMH, elles peuvent donc réagir rapidement lors de l'activation. Les cellules T $\gamma\delta$ différenciées expriment des niveaux élevés d'IFN- γ , des récepteurs de cellules tueuses naturelles, et d'autres cytokines, et semblent posséder une activité antivirale. Elles sont détectées après 21 semaines de grossesse, cependant, la mesure dans laquelle ces cellules participent à la défense antivirale *in utero* n'est pas encore bien définie.

6.2.4. Réponse humorale (anticorps)

Le rôle protecteur des anticorps vis-à-vis de la transmission maternofoetale est fortement suggéré par la diminution marquée du risque de transmission chez les femmes séropositives. La réponse humorale cible principalement les protéines d'enveloppe gB et gH. D'autres protéines virales peuvent induire la production d'anticorps, dont les protéines tégumentaires pp150 ou pp65, mais également le

complexe gH/gL/UL128-131A nécessaire à l'infection des cellules endothéliales (Jackson et al., 2011). Le taux d'anticorps anti pentamère et plus spécifiquement anti gH/gL a été corrélé à une diminution de la transmission chez 14 femmes en cours de primo-infection. De façon intéressante la virémie était également moindre chez les non transmettrices (Lilleri et al. 2013).

Bien que les anticorps jouent un rôle contre l'infection à CMV, la protection est incomplète. Le CMV peut être transmis au fœtus lors des infections secondaires réinfections ou réactivations, et peut infecter facilement le nouveau-né allaité, même si celui-ci a reçu passivement des anticorps maternels.

En plus de fournir un effet protecteur pour le fœtus infecté par le CMV, les anticorps semblent exercer une protection au niveau du placenta. Dans une évaluation échographique de l'épaisseur du placenta, les femmes atteintes d'une infection à CMV qui avaient un fœtus ou un nouveau-né avec une maladie à CMV possédaient un placenta significativement épaissi par rapport aux femmes atteintes d'une infection à CMV dont le fœtus ou l'enfant n'était pas atteint (La Torre et al., 2006).

Paradoxalement, les anticorps maternels peuvent favoriser la transmission du virus au fœtus, via l'expression du récepteur Fc néonatal sur les syncytiotrophoblastes. Il a été démontré que les complexes anticorps-virus peuvent déplacer la barrière syncytiale via ce récepteur, permettant l'entrée du virus dans la circulation fœtale, (Maidji et al., 2006).

7. Modèles d'études de l'infection congénitale à CMVH

Afin de comprendre au mieux les mécanismes d'infection du fœtus par le CMVH à travers le placenta, il est nécessaire de développer des modèles se rapprochant au plus près des événements *in utero*. Nous verrons dans ce chapitre les différents modèles *in vitro*, *ex vivo* et *in vivo* qui ont permis une meilleure compréhension des mécanismes d'infection congénitale à CMVH.

7.1 Modèles d'infection cellulaire *in vitro*.

Plusieurs types cellulaires peuvent être utilisés pour l'étude de l'infection à CMVH *in vitro*, comme les fibroblastes, les cellules endothéliales, les HUVEC. Les cellules les plus intéressantes dans le cas de l'infection congénitale sont les cellules de type trophoblastique.

En 1998, *Hemmings et al* ont pu ainsi développer des cultures de trophoblastes isolés à partir de placentas de troisième trimestre de grossesse, ainsi que d'explants villositaires et des fibroblastes issus du chorion de placentas du premier trimestre. Ces cultures *in vitro* ont permis de démontrer la permissivité des trophoblastes à l'infection CMVH, ainsi qu'à établir des cinétiques virales entre différentes souches de CMVH; en effet, la souche Davis infecte moins rapidement les CT issus de placentas à terme que Towne ou AD169.

Des cultures de ces cellules ont été développées à partir de trophoblastes isolés de placentas à terme. Afin de les différencier en cytotrophoblastes, l'utilisation du facteur de croissance EGF (Epithelial Growth Factor) est possible. Sans ce

facteur, les cellules s'associent pour former des syncytiotrophoblastes (Fisher et al., 2000).

7.2 Modèles *ex-vivo*

Les modèles de cultures cellulaires ne sont pas suffisants pour appréhender l'infection dans les organes entiers. Des modèles d'explants placentaires ont été développés afin de mieux comprendre les mécanismes de l'infection congénitale à CMVH. Ces modèles *ex-vivo* reproduisent l'interface materno-foétale, avec une matrice cellulaire infectée par des souches de CMVH et une éponge de gélatine sur laquelle est déposée l'explant à infecter. Ainsi, le placenta n'est pas en contact direct avec le milieu contenant du virus produit par la matrice cellulaire, et l'infection se fait uniquement à travers l'éponge.

Ce modèle a été utilisé sur des explants placentaires de premier trimestre provenant d'avortements volontaires et de troisième trimestre provenant de césariennes (Hamilton et al., 2012),(Lopez et al., 2011). Il existe également des modèles *ex-vivo* de la décidua. (Weisblum et al., 2011). Ces modèles ont permis de montrer des différences de cinétiques d'infection virale: par exemple, la souche Toledo, qui est similaire aux souches cliniques de CMVH, donnera de hauts titres viraux dans les explants, tandis que les souches AD169 et Towne se propagent moins bien dans les tissus (Tabata et al., 2012).

7.3 Modèles animaux

L'utilisation de modèles animaux pose problème pour l'étude de l'infection congénitale à CMVH. En effet, le virus possède une spécificité d'hôte stricte et il est

impossible de l'utiliser pour infecter des animaux en gestation. Cependant, par analogie avec les symptômes induits par le virus, certains modèles de l'infection congénitale à CMV existent.

7.3.1 Souris

La souris *mus musculus* est un modèle animal couramment utilisé en recherche pour sa facilité d'entretien. Il existe un cytomégalovirus murin (MCVM) qui permet d'étudier la maladie du CMV murin dans des modèles immunodéprimés et immunocompétents. La souris est fréquemment utilisée pour tester de nouvelles molécules antivirales *in vivo*.

Cependant, la souris n'est pas un bon modèle de l'infection congénitale: en effet, le placenta de souris diffère du placenta humain, il s'agit d'un placenta hémotrichorial où les cytotrophoblastes forment un syncytium, il n'y a pas de contact direct avec le sang maternel à cause des nombreuses couches cellulaires qui séparent la circulation maternelle et fœtale (figure n°15). De plus, le MCMV est incapable de traverser la barrière placentaire, sans compter le temps de gestation très court (18 à 20 jours) qui ne permet pas de comparer avec une grossesse humaine.

Afin de contourner ces problèmes, des greffes peuvent être réalisées dans des souris immunodéficientes. Bravo et al ont ainsi utilisé des éponges de gélatine sur lesquelles se trouvaient des fibroblastes, et ont pu constater qu'au bout de 14 jours post greffe, une vascularisation se mettait en place autour de l'éponge (Bravo

et al., 2007). Avec ce modèle, ils ont pu ainsi tester le ganciclovir (GCV) en injection intrapéritonéale.

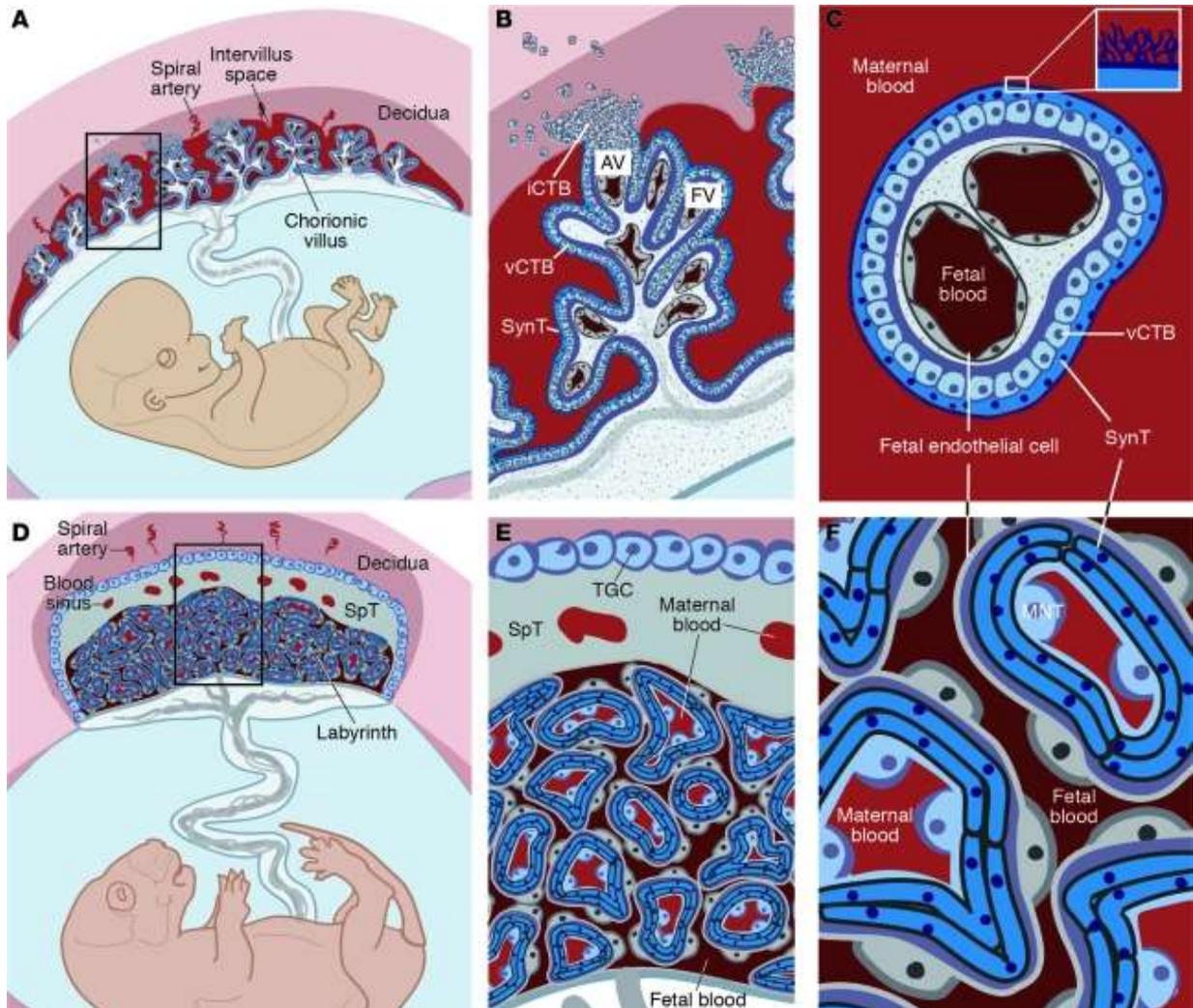


Figure n°23: Comparaison entre le placenta murin et le placenta humain **A**. Le placenta humain hémomono-chorial est une structure villositaire ancrée dans la caduque utérine via le trophoblaste extravilloux, baignant dans le sang maternel. **B**. L'interface utérus-trophoblaste humain est composée de fibroblastes de la décidua et de leucocytes maternels juxtaposés au trophoblaste extravilloux (EVT) fœtal. Certaines cellules de ce trophoblaste extra-villoux migrent dans le myomètre, tandis que d'autres remodelent les artères spiralées maternelles, beaucoup restent reliées à une colonne de trophoblastes qui s'étend dans la villosité fœtale et s'arrête à une membrane basale qui sépare le trophoblaste des capillaires du fœtus. **C**. Section transversale d'une villosité. Le sang maternel est séparé des vaisseaux fœtaux

uniquement par le syncytiotrophoblaste (SYN), dont la surface apicale est couverte par microvillosités denses, ramifiées. Sous le syncytiotrophoblaste, une couche mononucléaire de trophoblaste subsyncytial (MNT) qui est continue en début de grossesse, mais semi-discontinue dans les trimestres suivants. Les deux structures sont sous-tendues par une membrane basale.

D. Le placenta de souris est hemotri-chorial et forme un labyrinthe ancré dans la caduque, en étroit contact avec les vaisseaux maternels et fœtaux. **E.** Spongiotrophoblast (SPT) et trophoblaste de cellules géantes (TGC) (analogues aux EVT) : La caduque est essentiellement composée de leucocytes et de fibroblastes, ainsi que des artères maternels modifiées par des cellules géantes trophoblastiques. **F.** Section du labyrinthe. Séparant le sang fœtal du sang maternel on trouve une couche de trophoblaste mononucléaire (MNT) recouvrant deux couches de syncytiotrophoblastes et l'endothélium fœtal (FE) (Maltepe et al., 2010)

7.3.2 Primates

Les primates sont les modèles animaux les plus proches des êtres humains. Ils sont utilisés dans des études antivirales depuis les années 1990. Le macaque rhésus est le modèle le plus proche de l'humain pour l'infection à CMV. En effet, les symptômes de l'infection à RhCMV, qu'ils soient chez les sujets adultes, ou lors de l'infection intra utérine sont les mêmes que ceux retrouvés chez l'être humain. Cependant, peu d'animaux sont RhCMV négatifs, et malgré le séquençage entier du génome du CMV et la disponibilité d'un BAC infectieux, ce modèle est peu utilisé (Powers and Früh, 2008).

7.3.3 Cobayes

Le cobaye («Guinea pig,»,GP) est utilisé notamment comme modèle d'étude de l'infection congénitale. En effet, le placenta de cet animal est similaire au placenta humain, avec une couche homogène de trophoblastes endothéliaux qui séparent les

circulations maternelles et fœtales. De plus la gestation (qui dure 70 jours) peut être divisée en trois trimestres comme celle des humains. Les affections congénitales causées par le GPCMV sont similaires à celles causées par le CMVH (Schleiss and McVoy, 2010). Le foscarnet (PFA) et le cidofovir (CDV) sont efficaces pour enrayer l'infection systémique, voire réduire le taux d'infection congénitale pour le CDV. Le modèle cobaye a permis de tester des stratégies de vaccination et d'immunisation pour prévenir l'infection congénitale à GPCMV et ce depuis 1980 (Bia et al., 1980).

L'un des principaux inconvénients de l'utilisation du GPCMV est le manque de sensibilité aux antiviraux lorsque les cibles antivirales diffèrent; par exemple il est résistant au GCV et au maribavir (MBV), ceci pouvant s'expliquer par la faible homologie nucléotidique entre le gène *GPUL97*, et son homologue *UL97* du CMVH, responsable de la première phosphorylation du GCV permettant son activation. Cependant la création, par mutagénèse, via l'utilisation d'un *bacterial artificial chromosome* (BAC) d'une chimère GPCMV avec un gène *UL97* humain permet l'obtention d'une souche animale qui devient sensible au GCV et MBV de façon similaire à une souche humaine.

Chapitre 3: Prise en charge et traitements du CMVH

1. Prévention de l'infection congénitale à CMVH

Le CMVH infecte 50 à 80% de la population mondiale, et l'infection congénitale à CMVH peut survenir suite à une primo-infection contractée lors de la grossesse. Les jeunes enfants sont l'un des principaux réservoirs du virus, et de plus, excrètent de grandes quantités de virus dans leurs urines, larmes, salive, tout en étant asymptomatiques. Ils sont donc une source importante d'infection primaire et de réinfection chez les femmes enceintes. Différentes études montrent que de simples mesures d'hygiène, tel le lavage des mains et des surfaces, réduisent les risques d'une séroconversion. En effet, une étude menée par Adler et al sur 166 femmes montre que l'application de ces règles réduit significativement le risque de séroconversion, et ce, même lorsque ces femmes ont déjà un enfant en bas-âge (Adler et al., 2004). Une autre étude menée sur un échantillon plus large (745 femmes séronégatives) confirme la réduction du risque d'une séroconversion avec une incidence de 7.6% pour le groupe contrôle à 1.2% pour le groupe appliquant les règles d'hygiène (Revello et al., 2015).

Ainsi, les précautions suivantes peuvent être prises pour limiter le risque de primo-infection:

- Eviter le plus possible le contact avec les sécrétions corporelles des enfants de moins de trois ans.
- Se laver soigneusement les mains en cas de contact avec les sécrétions corporelles.
- Nettoyer les surfaces et objets potentiellement contaminés.
- Manipulation des objets potentiellement contaminés avec des gants.

Cependant, ces précautions ne permettent pas d'éliminer complètement la transmission, notamment celles dues aux réactivations de virus endogène. Une étude française de 2012 menée sur 800 personnels soignants, montre que, si les symptômes et les conséquences sur le long terme liés au CMVH congénital sont connus (plus de 60%), près de 50% d'entre eux ne connaissent pas les risques de réinfection ou de réactivation du virus pendant la grossesse (Cordier et al., 2012). Il est donc important que les personnels soignants soient formés sur la question de l'impact du CMV congénital et du manque de traitements, afin de mieux informer les femmes enceintes.

2. Traitements et inhibiteurs du CMVH

Le CMVH humain est une cause majeure de complication chez les patients transplantés et les patients ayant contracté le virus du VIH en phase SIDA. Il existe des traitements virostatiques administrés en prophylaxie ou en traitement curatif, permettant de contrôler la réplication virale chez ces patients immunodéficients. Ceux-ci inhibent la réplication de l'ADN viral via leur action sur l'ADN polymérase du CMVH, cependant, leur utilisation prolongée ou répétée, rendue nécessaire par l'immunosuppression, induit une pression de sélection sur les souches virales, et favorise l'émergence de souches résistantes (voir figure n° 24). De plus, leur relative toxicité est un frein à leur utilisation pour certains patients et chez les femmes enceintes. Cependant, d'autres cibles thérapeutiques ont été découvertes, et certaines molécules peuvent réduire l'infection à CMVH. Dans ce chapitre nous ferons un point sur les différents inhibiteurs du virus existants.

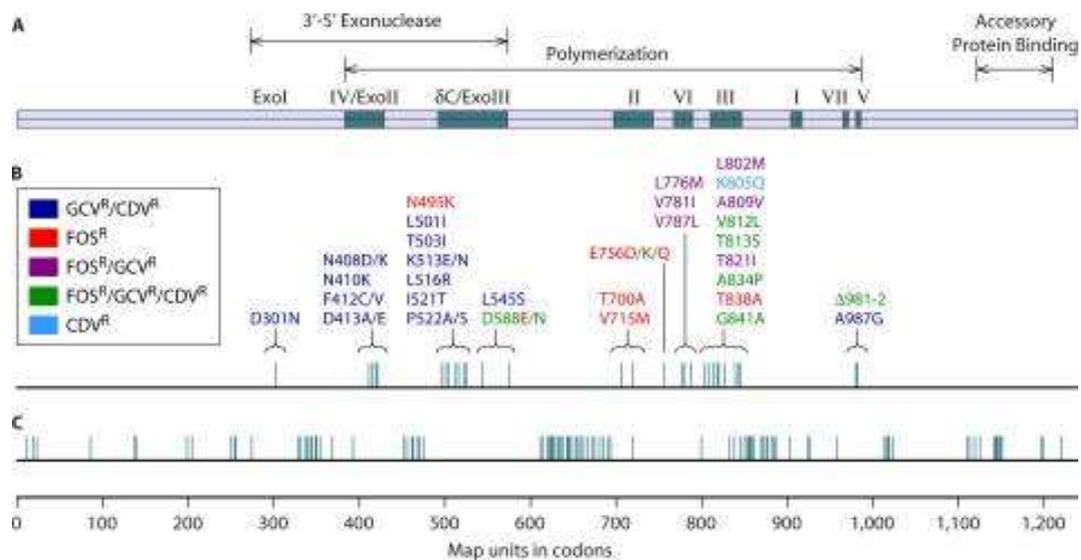


Figure n°24: carte des résistances aux inhibiteurs de la polymérase virale pUL54 (Lurain et chou 2010) A: Domaines fonctionnels de la polymérase virale du CMVh avec région IV/Exo II codons 379 à 421, région δC/Exo III codons 492 à 588, région II codons 696 à 742, région VI codons 771 à 790, région III codons 805 à 845, région I codons 905 à 919, région VII codons 962 à 970 et région V codons 978 à 988. B: Mutations confirmées colorées en fonction de la molécule pour laquelle est développée la mutation C : Polymorphismes observés chez les isolats sensibles

sous forme triphosphorylée, la première phosphorylation étant effectuée par la kinase virale pUL97, les deux suivantes par les kinases cellulaires.

Le valganciclovir est une prodrogue orale du ganciclovir permettant d'atteindre des concentrations plasmatiques équivalentes à celles du ganciclovir intraveineux

2.1.2 Cidofovir

Le cidofovir (1-(3-hydroxy-2-phosphonylméthoxypropyl)-cytosine) est un analogue nucléotidique de la cytidine, qui nécessite deux phosphorylations par les enzymes cellulaires afin d'être actif. Contrairement au ganciclovir, les étapes de son activation sont indépendantes de la kinase virale pUL97. Il peut être administré par perfusion à hauteur de 5 mg/kg/semaine pendant deux à trois semaines aux patients atteints par le VIH. Sa toxicité peut amener également à une neutropénie mais aussi à une destruction tubulaire proximale.

2.1.3 CMX001 (brincidofovir)

Il s'agit d'un ester lipidique, prodrogue du cidofovir, qui a été développé contre les infections à smallpoxivirus (Painter and Hostetler, 2004) mais qui a démontré son efficacité contre d'autres virus à ADN, notamment les herpesvirus, les polyomavirus (Randhawa et al., 2006), adénovirus (Hartline et al., 2005) et orthopoxvirus (Hostetler, 2009) Il est absorbé par l'intestin grêle et transporté via des phospholipides, il traverse les membranes par diffusion passive et facilitée, et possède une longue vie intracellulaire. Une fois dans la cellule, le groupement lipidique est clivé et la molécule est phosphorylée par les kinases intracellulaires pour être convertie en cidofovir diphosphate. Contrairement au cidofovir, le CMX 001

ne se concentre pas dans les tubules proximaux du rein et n'induit donc aucune toxicité rénale.

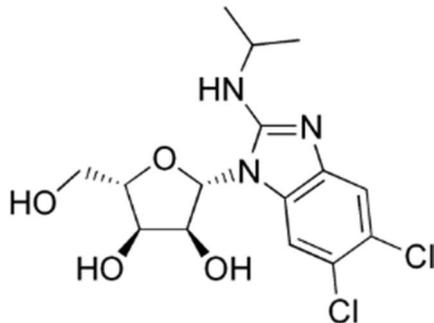
Une étude menée sur des patients greffés (greffe des cellules hématopoïétiques) traités 14 à 30 jours après la greffe a montré que l'infection à CMVH était réduite avec un traitement de 100mg ou plus administré une fois par semaine. Aucune myélosuppression ou néphrotoxicité n'ont été observées chez les patients, cependant un dosage de 200mg peut développer des diarrhées sévères (Marty et al., 2013).

2.1.4 Foscarnet

Utilisé en traitement de seconde intention, il peut être une alternative au ganciclovir pour les patients atteints de neutropénie, le foscarnet est un composé analogue des pyrophosphates, et ne nécessite, contrairement au ganciclovir et au cidofovir, aucune phosphorylation pour être actif. La molécule bloque l'ADN polymérase virale en se liant au site pyrophosphate. Cette molécule est utilisée en thérapie dans le cas de développement de souches résistantes au ganciclovir. Cependant, cette molécule reste toxique, notamment au niveau rénal.

2.2 Inhibiteurs de la kinase virale pUL97

2.2.1 Maribavir



Maribavir

Figure n° 26: Structure chimique du maribavir

Le maribavir (5,6,-dichloro-2-isopropylamino-1-β-l-ribofuranosyl-1H-benzimidazole, 1263W94) est un composé benzimidazole dérivé du BDCRB qui cible la kinase virale pUL97 et empêche ainsi la formation de néovirions. Cette molécule a montré de bons résultats sur des souches résistantes aux ganciclovir, mais a également favorisé l'émergence de souches virales résistantes.(Avery et al., 2010)

Alain et al 2014

De plus des tests effectués sur différentes lignées cellulaires (HEL, HFF et MRC5), ont montré une différence d'efficacité du maribavir selon les conditions de culture, dont la CI50 varie de 0.14 à 13,3 μM (Chou et al., 2006). Cependant, une fois associé à des molécules telles la roscovitine ou le sirolimus, les valeurs de CI50 redeviennent similaires dans les lignées cellulaires. L'efficacité du maribavir est également variable chez les patients chez les patients transplantés, en effet, si une partie d'entre eux répondent favorablement au traitement, d'autres ont vu leur

sérologie virale continuer d'augmenter. (Alain et al., 2013):(Snydman, 2011):(Marty and Boeckh, 2011)

2.3 Inhibiteurs des terminases virales

2.3.1 Benzimidazoles ribosides : TCRB et BDCRB

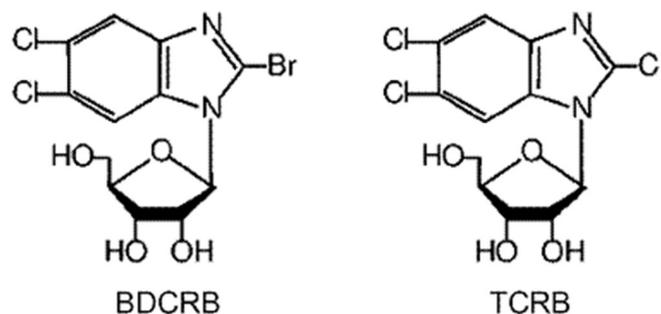
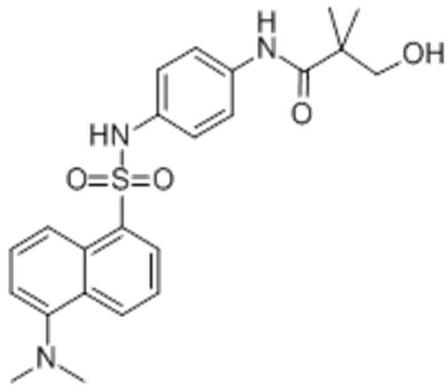


Figure n°27 : Structure chimique du BDCRB et du TCRB

Le TCRB (2, 5,6-trichloro-1-(β -D-ribofuranosyl)benzimidazole) et son dérivé le BDCRB (1H- β -D-ribofuranoside-2-bromo-5,6-dichlorobenzimidazole) sont des composés développés dans les années 90 afin de palier à la toxicité du DRB (6-dichloro-1-D-ribofuranosylbenzimidazole) (Townsend et al., 1995), (Zou et al., 1997) . Ces composés interagissent avec le complexe pUL56/pUL89, empêchant le clivage des concatémères d'ADN viral avant leur encapsidation. Le BDCRB a une forte action antivirale contre le CMVH *in vitro* (Townsend et al., 1995) et une étude menée dans des souris greffés avec du tissu foetal rétinien montre l'efficacité du BDCRB *in vivo* (Kern et al., 2004).

2.3.2 BAY 38-4766 (Toméglovir)

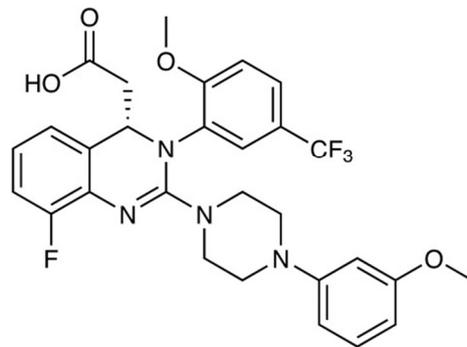


Toméglovir

Figure n°28: Structure chimique du toméglovir.

La molécule BAY 38-4766 (3-hydroxy-2,2-diméthyl-N-[4([5-(diméthylamino)-1-naphthyl] sulfonyl]amino)-phényl]propanamide) agit sur le clivage et le packaging des concatémères de l'ADN viral via les protéines virales du CMV pUL56 et pUL89. Cette molécule possède un fort pouvoir inhibiteur sur le CMVH *in vitro* et sur le MCMV en modèle *in vivo* de souris (Reefschlaeger et al., 2001). Il est capable d'inhiber la réplication virale d'isolats cliniques CMVH sensibles et résistants au GCV (McSharry et al., 2001). BAY 38-4766 semble être un bon candidat anti-CMV en raison de sa faible toxicité cellulaire et de sa bonne biodisponibilité orale (Buerger et al., 2001). Cependant, des mutants UL89 et UL56 sont résistants à ce composé (Evers et al., 2002).

2.3.3 Composés quinazoles: Letermovir.



Letermovir

Figure n°29: Structure chimique du letermovir

Le letermovir agit sur le complexe terminase du CMVH (Goldner et al., 2011) et empêche ainsi l'encapsidation de l'ADN viral dans les néocapsides (Verghese and Schleiss, 2013) avec une grande efficacité *in vitro* (CI50 comprise entre 15 et 30 nM). Il est également efficace *in vitro* contre l'infection d'autres herpesvirus, d'adénovirus et de rétrovirus (Marschall et al., 2012). De plus, le letermovir a montré son efficacité dans la réduction du titre viral d'un patient possédant des souches multirésistantes aussi bien aux analogues de base qu'aux dérivés de l'artémisine (Kaul et al., 2011) L'association du létermovir avec des inhibiteurs de l'ADN polymérase UL54 se révèle être additive (Wildum et al., 2015).

A ce jour, aucun cas clinique de résistance au létermovir n'a été reporté, cependant, des mutations dans le gène *UL56* induisant la résistance au létermovir ont été détectées *in vitro* (Goldner et al., 2014) (Goldner et al., 2015) (Chou, 2015).

Ces mutations se situent en N-terminal à proximité de potentiels motifs vraisemblablement impliqués dans la fonction de pUL56 (Champier et al., 2008) (Goldner et al., 2014). La molécule est actuellement testée en phase III d'essais cliniques.

2.4 Inhibiteurs de la signalisation cellulaire

2.4.1 Anti inflammatoires non stéroïdiens

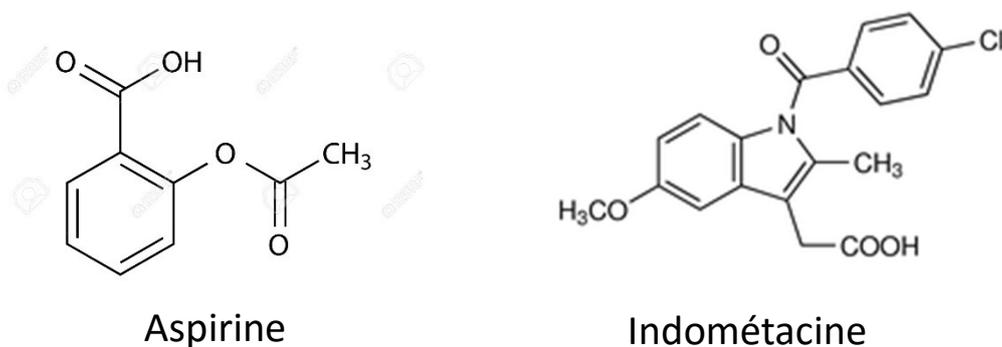
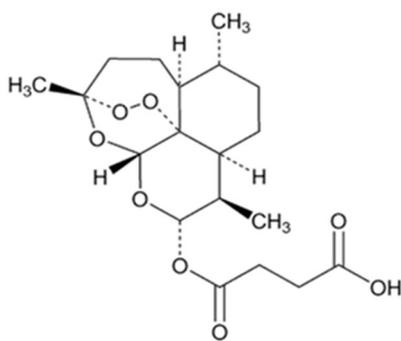


Figure n°30: Structure chimique de l'aspirine et de l'indométacine

Lors de son cycle d'infection, le CMVH induit la production de prostaglandine 2 (PEG₂) via l'enzyme cyclooxygénase 2 (COX-2) (Speir et al., 1998). Les anti-inflammatoires non stéroïdiens (AINS) tels l'aspirine, couramment utilisés comme antidouleur, inhibent les deux isoformes de l'enzyme (COX-1 et COX-2). Si l'inhibition de l'activité COX-2 diminue l'état inflammatoire, l'inhibition de l'activité COX-1 induit de nombreux effets secondaires dont des ulcères, ce qui explique l'effet à la fois bénéfique (inhibition COX-2) et délétère (inhibition COX-1). Fin des années 90, les premiers inhibiteurs spécifiques de la COX-2 sont développés, parmi eux le celecoxib et le rofecoxib.

L'aspirine et l'indométacine, deux composés inhibant de façon non spécifique les enzymes COX-1 et COX-2, peuvent réduire l'infection à CMVH *in vitro* (Speir et al., 1998). Une étude a également démontré l'efficacité du celecoxib dans des cellules de médulloblastome infectées par le CMVH (Baryawno et al., 2011) (Zhu et al., 2002).

2.4.2 Artésunate



Artésunate

Figure n°31: Structure chimique de l'artésunate

L'artésunate est un composé retrouvé dans une plante chinoise, utilisé comme traitement antipaludique de première intention ou par voie intraveineuse dans les formes résistantes d'accès palustres. L'artésunate est une molécule composée d'un sesquiterpène lactone et d'un pont endopéroxyde qui sera clivé après interaction de l'antipaludique avec les ions Fe²⁺. La libération des radicaux libres a un effet toxique sur le parasite et la vacuole. L'artésunate inhibe la réplication virale avant les étapes très précoces de la réplication, notamment en empêchant la phosphorylation de la pRB, bloquant ainsi le cycle cellulaire en G1 (Roy et al., 2015).

Un effet embryotoxique a été observé chez l'animal, mais pas chez l'humain, en effet, des femmes sous traitement antipaludéen durant le second ou dernier trimestre de grossesse n'ont pas rencontré d'effet indésirable. L'utilisation de l'artésunate durant le premier trimestre se fait cependant au cas par cas, faute d'études suffisantes à ce sujet. Cependant, sa faible toxicité au deuxième et troisième trimestre en font une molécule intéressante pour un éventuel traitement des femmes enceintes contractant le CMVH au cours de la grossesse.

Si l'artésunate montre des CI50 intéressantes dans différents types cellulaires (Schnepf et al., 2011), l'effet anti-CMVH de l'artésunate oral est variable en clinique, et dépend vraisemblablement du mode d'administration du produit, du fait de sa demi-vie courte (Wolf et al., 2011).

Par ailleurs, l'artésunate est efficace contre les souches virales résistantes aux thérapies conventionnelles (Kaptein et al., 2006) (Germi et al., 2014) et l'association de l'artésunate avec d'autres composés anti-CMVH tels le maribavir, le ganciclovir, le cidofovir et le foscarnet permet de réduire l'IC50 de ces derniers, ce qui fait de l'artésunate une molécule candidate pour de potentielles bithérapies anti-CMVH (Chou et al., 2011) (Kaptein et al., 2006).

2.4.3 Flavonoïdes

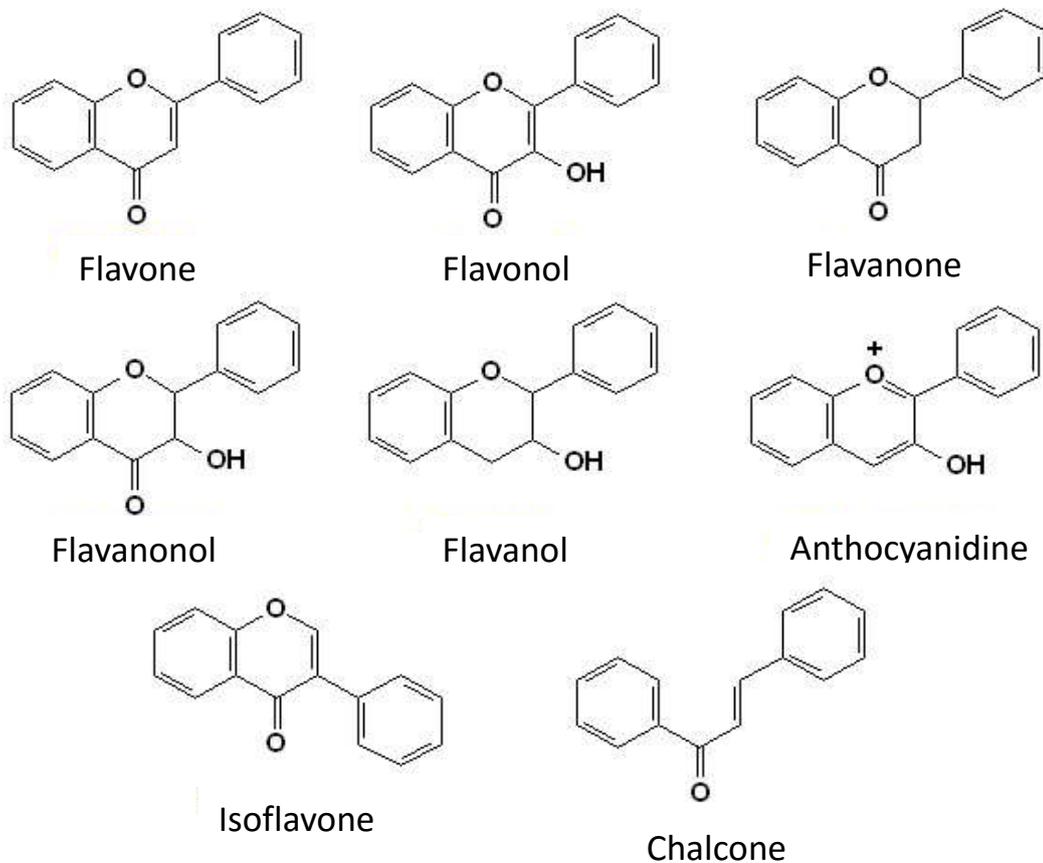


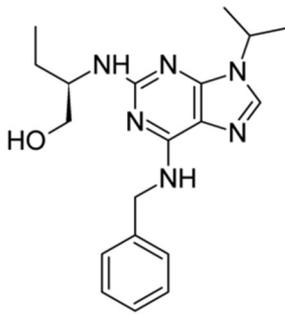
Figure n°32: Structure chimique de divers flavonoïdes

Les flavonoïdes sont des composés retrouvés dans les plantes, connus notamment pour leurs effets anti-inflammatoires et antioxydants. Il a été montré que ces molécules agissent sur de nombreuses voies cellulaires et qu'elles possèdent des propriétés antimicrobiennes (Beecher, 2003).

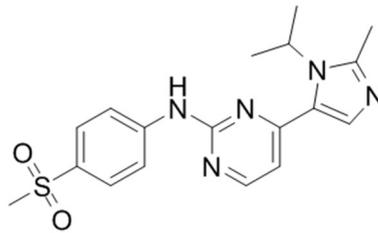
Des flavonoïdes ont été testés *in vitro* sur différentes souches de laboratoire et cliniques du CMVH, ainsi que sur l'herpès simplex. Plusieurs d'entre eux, particulièrement les trihydroxychalcones, se sont avérés toxiques sur les fibroblastes.

Cependant, la baïcaléine et la quercétine se sont avérées efficaces contre l'infection *in vitro*. (Cotin et al., 2012)

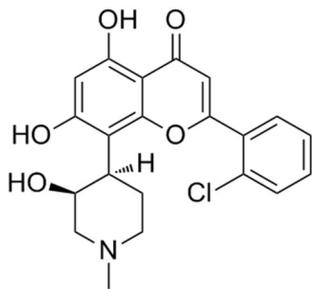
2.4.4 Inhibiteurs des cyclines kinases dépendantes.



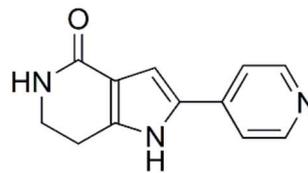
Roscovitine



AZD-5438



Flavopiridol



PHA-767491

Figure n°33: Structure chimique d'inhibiteurs des cdk.

Les kinases cellulaires sont importantes pour le bon déroulement du cycle cellulaire. Elles sont également utilisées par de nombreux virus pour leur réplication (Schang, 2002). La réplication du CMVH requiert les cdk1, cdk2, cdk7 et cdk9 (Marschall et al., 2011). Les inhibiteurs des cdk, utilisés en thérapies cancéreuses, peuvent être des composés potentiellement utilisés en thérapie antivirale. Des composés inhibant de façon compétitive l'ATP, comme le flavopropidol et la

roscovitine, montrent une bonne efficacité contre les herpèsvirus (Schang, 2002). Une étude de Bresnahan a démontré que la roscovitine, inhibant la cdk2, réduit l'infection virale à CMVH *in vitro* (Bresnahan et al., 1997). Cet inhibiteur empêche la phosphorylation de la protéine viral pUL69, impactant sa localisation intranucléaire mais également le transport des ARNm non épissés (Marschall et al., 2011) .

Le principal inconvénient de ces molécules est leur manque de spécificité vis-à-vis des kinases ciblées, ce qui induit de nombreux effets secondaires durant les traitements.

2.5 Immunosuppresseurs

2.5.1 Everolimus et sirolimus

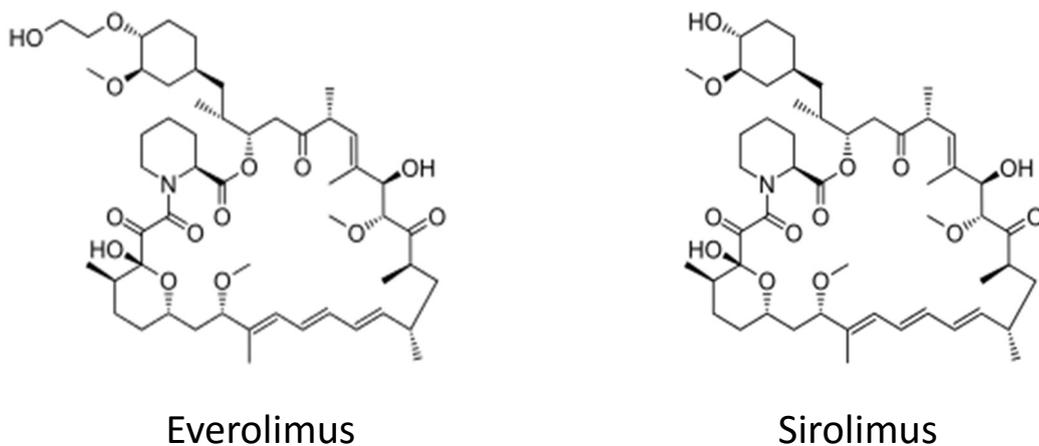
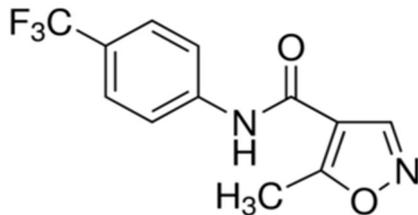


Figure n°34: Structure chimique de l'everolimus et du sirolimus

Le sirolimus et l'everolimus sont des inhibiteurs de la protéine mTOR, qui est une sérine-thréonine kinase régulant la prolifération cellulaire, la croissance cellulaire, la mobilité cellulaire, la survie cellulaire, la synthèse protéique et la transcription (Dreyer et al., 2009). Ces composés sont utilisés comme

immunosuppresseurs et possèdent une action sur la réplication du CMVH chez les patients transplantés (Nashan et al., 2012).

2.5.2 Léflunomide



Léflunomide

Figure n°35: Structure chimique du léflunomide

Le léflunomide (N-[4-trifluorométhylphényl]-méthylisoxazol-4-carboxamide) est un immunosuppresseur anti-inflammatoire utilisé depuis 1998 pour soigner l'arthrite rhumatoïde. Il inhibe la phosphorylation des protéines tyrosine et la voie de biosynthèse des pyrimidines (Sudarsanam et al., 2006). Comme les protéines de la capsid virale sont des phosphoprotéines, le léflunomide agit sur la morphogénèse des virions (Waldman et al., 1999). Cependant, malgré sa bonne biodisponibilité, le léflunomide n'est pas exempt d'effets secondaires: en effet, des cas d'anémie, de diarrhées ont été rapportés chez des patients transplantés. (Chacko and John, 2012).

3. Immunisation passive: les immunoglobulines

L'immunisation passive peut être envisagée pour réduire les effets pathogènes du CMVH. Une étude menée par Nigro et al entre 1995 et 2003 sur des femmes enceintes ayant contracté le CMVH pour la première fois pendant la

grossesse montre que les globulines hyper immunes réduisent l'infection congénitale à CMVH. En effet, seulement 16 % des femmes qui ont bénéficié de l'immunisation passive ont vu leur enfant être infecté par le CMVH, alors que 40% des femmes n'ayant pas été traitées ont eu un enfant infecté (Nigro et al., 2005) . Cependant, l'immunisation passive ne semble pas réduire l'infection in utero suite à une primo-infection. En effet, une étude a été menée sur 36 femmes, chez qui une primo-infection à CMVH a été diagnostiquée, ont été traitées avec l'immunoglobuline en intraveineuse pendant le premier ou le second trimestre de grossesse(Buxmann et al., 2012). Cette étude montre un faible impact de l'immunisation passive, en effet, 8 bébés (soit 22%) sont nés infectés et asymptomatiques, ce qui est une proportion équivalente à celle retrouvée dans l'étude effectuée par Enders en 2011 (23.8%). Cette étude portait sur l'infection intra-utérine du CMVH suite à une infection primaire sur un panel de 248 grossesses (Enders et al., 2011) .

Les immunoglobulines ont également été testées lors d'une étude randomisée de jeunes patients transplantés en 2009. Parmi eux, 62 ont reçu un traitement d'immunoglobuline. La combinaison du ganciclovir en prophylaxie et de l'injection d'immunoglobuline réduit le risque d'infection à CMVH, en effet, seuls 14 sujets traités avec l'immunoglobuline ont développé une maladie à CMVH comparé à 62 patients pour le groupe non traité (Ranganathan et al., 2009). Une étude de 2010 menée par Maidji et al montre l'impact d'un traitement par immunoglobulines sur le placenta. La réplication virale ainsi que les dommages dus au CMVH étaient inhibés par le traitement (Maidji et al., 2010).

4. Vaccins

Le CMVH est la première cause d'infection congénitale virale. Les traitements actuels, inhibant l'ADN polymérase virale, ne sont pas recommandés aux femmes enceintes du fait de leur potentiel tératogène sur le fœtus. La vaccination peut être envisagée afin de prévenir les primo-infections pendant la grossesse. Comme nous l'avons vu dans les chapitres précédents, cette situation aggrave le risque pour le fœtus de contracter le CMVH *in utero* et donc de présenter des séquelles dues au virus. La vaccination des patients transplantés peut être également envisagée, afin d'éviter la réactivation du virus due aux immunosuppresseurs.

La problématique du développement d'un vaccin contre le CMVH se pose dès les années 70 et un premier vaccin constitué de la souche AD169 atténuée est développé par Merck entre 1974 et 1979, suivi d'un vaccin constitué de la souche Towne atténuée dans les années 80 (Plotkin, 2015). Les années 90 verront le développement de différentes stratégies, dont des vaccins peptidiques, des vaccins recombinants Towne-Toledo et du premier vaccin canarypox (développé par Sanofi Pasteur).

Actuellement, aucun vaccin prévenant l'infection à CMVH n'est disponible, mais des vaccins sont en cours d'essai en phase clinique (voir figure n°36) (McVoy, 2013). Nous verrons dans ce chapitre les différents vaccins conçus pour contrer l'infection à CMVH.

Type	Vaccine	Developer	Components	Status
Live attenuated	Towne	Wistar	Whole virus	Phase 2
	Towne-Toledo 1, 2, 3, 4	Aviron/MedImmune	Whole virus	Phase 1
Subunit protein	gB/MF59	Chiron/Sanofi	gB/MF59	Phase 2
	GSK1492903A	GlaxoSmithKline	gB/ASO1	Phase 1
Subunit DNA vectored	TransVax	Vical	gB, pp65	Phase 2
	CyMVectin	Vical	gB, pp65	Late preclinical
Subunit viral vectored	AVX601	Alphavax/Novartis	gB/pp65-IE1	Phase 1

Figure n°36: tableau résumant des vaccins en cours de développement/essai clinique (Mc Voy 2013).

4.1 Vaccins constitués de souches virales vivantes

L'une des méthodes de vaccinations les plus couramment utilisées est l'utilisation de souches virales vivantes atténuées, donc non pathogènes, cette méthode stimulant la réponse immunitaire humorale et cellulaire. Ainsi, une étude réalisée en 1995 par Adler et al sur des femmes enceintes, en utilisant un vaccin constitué de la souche Towne atténuée par passages successifs sur des cultures de fibroblastes (Adler et al., 1995). Ce vaccin, testé sur des patients a été bien toléré. Cependant, il n'aide pas à la prévention de l'infection congénitale à CMVH.

4.2 Autres vaccins

D'autres stratégies vaccinales ont été testées, basées sur l'utilisation de vaccins inertes, constitués par exemple de plasmides bi et trivalents (pp65, gB, IE1), de peptides, de vaccins chimères composés de plusieurs souches de CMVH, ou de vaccins recombinants exprimant la gB, basés sur un canary pox atténué (Bernstein et al., 2002). Le vaccin Transvax qui est constitué de plasmides gB ou pp65 a été utilisé sur patients transplantés avec une bonne efficacité (Kharfan-Dabaja and

Nishihori, 2015), mais également dans la prévention de la transmission du CMVH chez les femmes en âge de procréer (Pass et al., 2009).

Le vaccin Sanofi Pasteur gB avec adjuvant MF59 a été étudié dans deux essais de phase 2 qui ont montré que le vaccin évite la séroconversion de 50% des femmes séronégatives (Griffiths et al., 2011). Toutefois, cet effet est observé uniquement lors de la première année suivant la vaccination.

Malgré ces résultats encourageants, la question de la population à vacciner n'est pas résolue. Afin de réduire l'infection congénitale, la campagne de vaccination peut cibler les femmes enceintes, soit avant la première grossesse, soit lors de l'accouchement. Les adolescents peuvent également être une cible vaccinale, mais les tout-petits sont une autre population potentielle. En effet, les nourrissons excrètent d'importantes quantités de virus tout en étant asymptomatiques, et sont une source d'infection primaire et de réinfection chez les femmes enceintes. Cependant la vaccination des très jeunes enfants (moins de 2 ans), si elle pourrait éviter l'apparition de symptômes liés au CMVH, pose des soucis d'un point de vue éthique.

Chapitre 4: Etude expérimentale

Objectifs de l'étude expérimentale

Le cytomégalovirus humain est un virus impliqué dans de nombreuses pathologies chez les patients immunodéficients, et est devenu la première cause d'infection virale congénitale depuis la mise en place de la vaccination contre la rubéole. Les antiviraux actuels, inhibiteurs de la polymérase virale, favorisent l'émergence de mutations de résistance, et sont contre indiqués durant la grossesse du fait de leur toxicité et leur possible tératogénéicité. Il devient donc nécessaire de trouver de nouvelles molécules thérapeutiques et de développer des modèles d'infection placentaire afin de mieux comprendre les mécanismes impliqués dans l'infection *in utero* par le CMVH.

Le CMVH altère la balance Th1/Th2 nécessaire au bon maintien d'une grossesse viable. L'induction de cytokines pro-inflammatoires peut constituer un facteur important dans le développement de pathologies chez le fœtus infectés.

Les objectifs de ce travail de thèse ont été:

- ✓ de tester de nouvelles molécules au potentiel antiviral, notamment des inhibiteurs de l'enzyme cyclooxygénase-2, dans le modèle d'infection *in vitro* sur lignée fibroblastique couramment utilisée au sein de l'UMR1092.

- ✓ de développer un modèle viable de culture d'explants ex-vivo de premier trimestre de grossesse.
- ✓ d'étudier l'efficacité antivirale de différents composés antiviraux dans le modèle d'explants de 1^{er} trimestre de grossesse
- ✓ de comparer les évènements inflammatoires via notamment la production de cytokines entre premier et troisième trimestre de grossesse dans un même modèle de culture d'explants placentaires, afin de mieux comprendre les mécanismes induits par le CMVH. Cette dernière partie a été réalisée en collaboration avec le laboratoire de recherche en virologie du Pr WD Rawlinson, Prince of Wales Hospital à l'université de Sydney.

Résultats

Etude de l'effet de molécules inhibitrices de l'infection à CMVH *in vitro*.

1. Introduction

La première partie de ce travail de thèse a été d'étudier de nouvelles molécules au potentiel anti-CMVH. En effet., comme nous l'avons vu précédemment, le cytomegalovirus humain est un pathogène opportuniste, qui, s'il ne provoque pas de complications chez le sujet immunocompétent, pose de nombreux problèmes chez les patients à risques tels les personnes atteintes du syndrome d'immunodéficience acquise (SIDA) ou les transplantés allogéniques. Le CMVH est également retrouvé dans de nombreuses tumeurs cancéreuses, notamment dans les médulloblastomes et glioblastomes. Même s'il n'est pas oncogène, l'instauration d'un état pro-inflammatoire et les effets anti-apoptotiques de sa kinase pUL97 favoriseraient l'expansion des cellules cancéreuses. Il a été démontré que l'utilisation des traitements antiviraux anti-CMV conventionnels permet la réduction de ces tumeurs (Hadaczek et al., 2013).

Cependant, les traitements inhibant la réplication virale, utilisés en prophylaxie ou en traitement de l'infection à CMVH, induisent chez les patients une pression de sélection sur les souches virales, amenant à l'émergence de résistances. Il est donc nécessaire de rechercher de nouvelles cibles thérapeutiques.

L'utilisation d'anti-inflammatoires non stéroïdiens, telle l'aspirine, a montré leur effet sur l'infection à CMVH (Speir et al., 1998). Cependant, ces composés ont de nombreux effets adverses, notamment sur le tractus gastro-intestinal. Des composés

inhibant la COX-2, uniquement impliquée dans les mécanismes inflammatoires ont été développés afin d'éviter ces désagréments, cependant, certains ont dû être retirés du marchés suite aux problèmes cardiaques qu'ils induisent.

L'équipe EA 1069 de la faculté de Pharmacie de Limoges a développé des composés associant une structure flavonoïdique et des radicaux retrouvés dans les inhibiteurs de la COX-2 afin de réduire la toxicité des molécules. En effet, les flavonoïdes sont des composés présents dans les plantes, aux propriétés anti-inflammatoires et antimicrobiennes largement décrites.

Nous nous sommes intéressés à ces composés pour leur effet sur la production de la prostaglandine (10 μ M de ces composés peuvent réduire de plus de 75% l'activité COX-2)(Gueye, 2013). Ainsi, nous avons testé leur toxicité et leur potentiel anti-CMVH *in vitro* et les avons associés avec d'autres molécules connues pour leur action sur le virus. Nous avons comparé les résultats obtenus avec l'indométacine, un anti-inflammatoire non stéroïdien inhibant de façon non spécifique les enzymes COX-1 et COX-2. L'ensemble de ces résultats a été soumis à la revue *Antiviral Research*.

2. Article: New cyclooxygenase II inhibitors and their impact on HCMV infection in vitro.

Impact of new cyclooxygenase II inhibitors on HCMV replication *in vitro*.

D. Andouard^{1,2,3}, *R. Gueye*⁴, *S. Hantz*^{1,2,3}, *L. Bernardaud*^{1,2,3}, *C. Pouget*⁴, *C. Fagnère*⁴, *J.L Duroux*⁴, *S. Alain*^{1,2,3}

(1) Univ. Limoges, UMR 1092, Limoges, France.

(2) INSERM, UMR 1092, Limoges, France.

(3) National Reference Center for Cytomegaloviruses, Laboratoire de Bactériologie-Virologie-Hygiène, CHU Limoges, Limoges, France

(4) Univ. Limoges, EA1069, Limoges,

Corresponding author:

Pr Sophie Alain

Laboratoire de Bactériologie-Virologie-Hygiène, CBRS, CHU Limoges, 2 ave ML King

87000 Limoges

Tel 05 55 05 67 74

sophie.alain@unilim.fr

1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60
61
62
63
64
65

1. Introduction:

1
2
3 Human cytomegalovirus (HCMV) is an opportunistic virus involved in severe complications
4
5 in immunocompromised patients like transplant recipients. Moreover, even if it is not an
6
7 oncogenic virus, an association between HCMV and some cancers like glioblastomas and
8
9 medulloblastomas has been suggested ¹. Indeed, HCMV pp65 and IE proteins are found in
10
11 tumoral tissue ² and the virus interferes with different pathways of oncomodulation to increase
12
13 its own replication^{3,4}. One of these oncomodulatory pathways is the production of
14
15 prostaglandin 2 (PGE2) that promotes inflammatory conditions. PGE2 is a product of
16
17 cyclooxygenase 2 (COX-2), an enzyme produced in inflammatory conditions only, in contrary
18
19 to cyclooxygenase 1 (COX-1) which is a constitutive enzyme ⁵. Amount of COX-2 increases
20
21 when cells are infected with HCMV and it has been shown that COX-2 is needed for viral
22
23 infection⁶. And non-specific COX inhibitors, such as aspirin and indomethacin, inhibit
24
25 HCMV infection *in vitro*.^{7,6}.

26
27
28
29
30
31
32
33 Aspirin and indomethacin belong to non-steroidal anti-inflammatory drugs (NSAIDs), which
34
35 are worldwide used for their anti-inflammatory and analgesic effects, but are associated to
36
37 serious adverse effects like gastric bleeding or perforation and hepatotoxicity⁸ due to the
38
39 COX1 inhibition. Specific COX-2 inhibitors were developed to reduce these adverse effects,
40
41 but they were found to be responsible for cardiac side effects. So, there still a need for safer
42
43 compounds.

44
45
46
47
48
49 With this aim, some new chalcones with substituents found in conventional anti-COX
50
51 compounds have been recently synthesized. Chalcones belong to the flavonoid family,
52
53 molecules widespread in plants known for their antioxidative, anticancer and antimicrobial
54
55 properties⁹. Flavonoids can inhibit COX-2 expression and furthermore, they also have
56
57 interesting antiviral properties against herpesviruses including CMV^{10,11}. Among those, new
58
59
60
61
62
63
64
65

1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60
61
62
63
64
65
compounds RG193 (4'-chloro-2'-hydroxy-4-sulfamoylchalcone), RG194 (2'-hydroxy-4'-methyl-4-sulfamoylchalcone), RG998 (2'-hydroxychalcone) and RG1401 (2'-hydroxy-4'-methyl-4-methylsulfonylchalcone) were shown by EA1069 to significantly inhibit PGE₂ production (data not shown).

As these compounds could have an interest against HCMV infection, their antiviral activity and toxicity were tested *in vitro*. Combinations with other antiviral compounds were also evaluated, as the association of valganciclovir and the specific COX-2 inhibitor celecoxib prevented HCMV replication *in vitro* and reduced medulloblastoma tumor cell growth¹².

2. Methods:

2.1 Compounds

COX-2 inhibitors RG193, RG194, RG1401 and RG998 (chemical structures shown in Figure 1) were synthesized by EA1069 research team (Limoges University, France), diluted in dimethylsulfoxide (DMSO, Sigma, Ilkirch France) at 10 mg/mL, and stored at -80°C. Baicalein (BAI) and quercetin (QUER) were given by EA4021 research team (Limoges University, France) and were prepared as described above. Indomethacin was purchased from Sigma (Ilkirch, France) and was prepared and stored like previous compounds. Ganciclovir (GCV) (Cymevan®, Roche Pharma, Neuilly, France) was purchased from providers. Maribavir (MBV) (Viropharma Incorporated, Exton, USA) and artesunate (ART) (Janssen, Titusville, USA) were provided by Viropharma and Janssen laboratories respectively.

2.2 Viruses and cell culture

For antiviral assays a laboratory strain AD169-GFP (gift from Eva Borst and Martin Messerle, University of Hannover, Germany) and three clinical isolates were used: TROA07, one naïve isolate from congenitally infected newborn, and two multi-drug resistant strains,

1 CHAJ06, with an UL97 C592G and UL54 N408K and G841A substitutions, and JAMP01,
2 with an UL97 A595S substitution.
3

4 Human embryonic lung (HEL) fibroblasts (MRC-5) (bioMérieux, Lyon, France) were
5 cultured in modified Eagle's medium Glutamax (Eurobio, Les Ulis, France) supplemented
6 with 10% fetal bovine serum (FBS), 1% gentamycin, 1% penicillin and used between
7 passages 25 and 35.
8
9
10
11
12
13

14 2.3 Cytotoxicity assay 15

16 Toxicity of compounds and associations was measured using the CytoTox96 Non-Radioactive
17 cytotoxicity assay (Promega, Charbonnières, France), in confluent or non-confluent MRC-5 in
18 96-well plates. This assay determines the lactate dehydrogenase (LDH) activity in the residual
19 cells after incubation with the tested drug. Five days post-treatment, LDH activity was
20 determined by measuring colored reaction with an O.D. reader. At each concentration of drug,
21 the absorbance at 490 nm was compared to control wells with the same compound
22 concentration without cells. The 50% cell cytotoxicity (CC₅₀) and 90% cell cytotoxicity
23 (CC₉₀) were determined graphically as the concentration of molecule, which causes 50% and
24 90% cellular death, respectively.
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43

44 2.4 Antiviral plaque reduction assay 45

46 Antiviral assays were conducted as previously described¹⁰ with some modifications. Briefly,
47 a 48 well plate of MRC-5 confluent cells was infected for 3h with the AD169-GFP strain or
48 with the isolate, at a multiplicity of infection (MOI) of 0.01.infected-cell/cell to reach 25 to 50
49 plaques per well. Then the medium was removed and cells were incubated with different drug
50 concentrations for five days. Foci of infected cells were visualized on optical microscope (or
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60
61
62
63
64
65

1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60
61
62
63
64
65

fluorescent microscope for AD169-GFP) and counted; 50% inhibitory concentrations IC₅₀ were determined graphically.

2.5 Western blot analysis

To investigate the viral replication step inhibited by these new anti COX-2 western blot analysis was performed. RG 193, RG 194, RG 998, RG 1401 and indomethacin were added on 25-cm² flask of AD169-GFP-infected MRC-5 at a concentration of four-fold IC₅₀. After a 5 days incubation period, cells were washed with cold PBS 1%, and 500 μL of RIPA lysis buffer (150 mM sodium chloride, 1.0% NP-40, 50 mM Tris, pH 8.0) with anti-proteases (1/1000, Sigma, Ilkirch, France) were added on cells. After 5 minutes at 4°C, lysate was harvested and centrifuged at 10 000 g at 4 ° C and supernatant was stored at -20°C. Samples were mixed with equal volume of Laemmli buffer, heated 10 min to 94°C with 1% DTT and 1% β-mercaptoethanol. 20 μL of mix were loaded onto a 6% sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel. After electrophoresis and transfer,(on a Biorad apparatus) viral proteins were detected by E13 mouse monoclonal antibody anti-HCMV immediate early IE1-72 and IE2-86 proteins (BioMérieux, Meylan, France) and revealed with the WesternDot™ 625 kit (Invitrogen,Carlsbad, USA), under UV light, following provider's instructions. Protein levels were estimated by semi-quantitative measurement of intensity of the bands using ImageJ software, comparing with the control and the β-actin level (revealed with an anti β-actin antibody from Sigma, Ilkirch, France).

2.6 Synergy trial

MRC-5 cells were infected in the same conditions as for a plaque reduction assay. Cyclooxygenase inhibitors were associated with other antiviral compounds: artesunate (ART), maribavir (MBV), quercetin (QUER) and baicalein (BAI), and GCV. Antiviral compounds

1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60
61
62
63
64
65

were associated at 2-fold IC₅₀; IC₅₀, ½ IC₅₀ and ¼ IC₅₀. The data were analyzed with Compusyn© software ¹³, and the combination index (CI) was calculated for each association in constant ratio of compounds. Values of CI determined the effect of the association: CI<0.9: synergy; 0.9≤CI<1.1: additive effect; CI>1.1: antagonism.

3. Results:

3.1 Cytotoxicity assay

All values are reported in Table 1. Cytotoxicity of new compounds was evaluated on confluent and growing MRC-5 cells and compared with indomethacin and ganciclovir toxicity. Ganciclovir is the less toxic molecule, with a CC₅₀ higher than 2 mM both in confluent and growing cells. All cyclooxygenase inhibitors were more toxic in confluent than in growing cells. Indomethacin reached a CC₅₀ of 2 mM in growing fibroblasts, but is more toxic in confluent cells (CC₅₀ = 250 μM). All new compounds had a higher toxicity than indomethacin. Among all tested molecules, RG1401 is the most toxic with a CC₅₀ of 41.7 μM found in growing cells and a CC₅₀ of 50 μM in confluent cells. RG193, with a CC₅₀ of 1500 μM in growing cells and 185 μM in static cells, was similar to indomethacin.

3.2 Antiviral activity

Compounds were tested on the laboratory strain AD169. All IC₅₀ were 10 fold higher than ganciclovir IC₅₀; furthermore new compounds and indomethacin shown similar antiviral activity. Compounds were also tested on several clinical HCMV strains. The IC₅₀ and their sensitivity to new antiviral compounds were determined. For each clinical strain, sensitivity indexes 50% for cyclooxygenase inhibitors were lower than 2.

3.3 Inhibition of early viral steps

1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60
61
62
63
64
65

Expression of HCMV immediate early proteins were analyzed in presence of the new COX-2 inhibitors and indomethacin by western blotting (Figure 3). The IE71 and IE2-86 proteins were expressed in our control (viral culture without compound). Whatever the compound except RG1401, 4-fold IC₅₀ dose reduced expression level of immediate early proteins. Thus, 4-fold IC₅₀ of RG998 and RG193 inhibited totally expression of immediate early proteins.

3.4 Association of RG193 with other antiviral compounds

RG193 was associated with other compounds inhibiting HCMV replication: two flavonoids, baicalein (BAI) and quercetin (QUER)¹⁰, artesunate (ART)¹⁴, an antimalarial compound, maribavir (MBV), an UL97 inhibitor¹⁵ and GCV, used as the reference treatment. Efficiency of these associations was compared with associations of indomethacin with the same compounds. Compusyn© software was used to determine the combination index (CI) and the kind of association: synergistic, additive or antagonistic. (See results in Table 2)

Association of RG193 was synergistic with MBV or BAI, additive with GCV or ART, and antagonistic with QUER. Concerning the non-specific cyclooxygenase inhibitor indomethacin, only the association with MBV was synergistic; adding flavonoids or ART resulted to antagonistic effect and finally, association with GCV was additive.

4. Discussion

HCMV involvement in some cancer development has been suggested. Indeed, to enhance its replication, it increases amount of COX-2 enzyme in infected cells and establishes an inflammatory state⁷. In gliomas, level of COX-2 expression was directly correlated to glioma grade and associated with shorter survival in glioblastoma patients¹⁶. Non-steroidal anti-inflammatory drugs, capable of inhibiting cyclooxygenase, significantly suppressed the growth of glioblastoma and medulloblastoma in preclinical models^{17,18}. Also, short-term use (< 10 years) of anti-inflammatory medication was associated with a protective effect against

1 glioblastoma¹⁹. Furthermore, targeting HCMV could reduce the tumor growth and improved
2 survival of patients with glioblastoma receiving the ganciclovir prodrug, valganciclovir²⁰.
3
4 Moreover, the association of a CMV inhibitor and a specific anti-COX-2 drug is known to
5 enhance this reduction¹². However, COX-2 inhibitors have various side effects, and there is a
6 need for safer drugs. In the present study, four recently developed anti-COX-2 compounds
7 were tested against HCMV infection *in vitro*. These compounds associating a flavonoid core
8 and substituents found in conventional COX-2 inhibitors were found to significantly reduce
9 PGE2 production (personal data from R Gueye, EA 1069, Limoges University). .
10
11

12
13
14
15
16
17
18
19
20 Regarding toxicity of these compounds, all of them were more toxic than ganciclovir and
21 indomethacin, but with various levels. RG194 and RG1401 compounds have substituents
22 found in coxibs like celecoxib (CH₃ and SO₂ NH₂) and etoricoxib (SO₂CH₃ and CH₃)²¹. The
23 SO₂NH₂ group seems to increase the toxicity of RG1401 compared to RG998. RG193 is the
24 less toxic compound, the presence of a chlore atom seems to reduce toxicity compared to
25 RG194 which has a CH₃ group. However, they are less toxic than other chalcones (tri
26 hydroxy chalcones) that we have previously tested¹⁰.
27

28
29
30 We demonstrated that these molecules have an antiviral efficacy similar to the non-specific
31 cyclooxygenase inhibitor indomethacin. Moreover, all those compounds are effective against
32 clinical multi-drug resistant strains and congenital strains. Interestingly, we observed a
33 stronger antiviral efficiency of indomethacin on congenital strain than on laboratory or
34 resistant strains. As expected, all the compounds act before the early stage of the viral cycle,
35 except RG1401, which antiviral efficiency seems to be correlated to its high toxicity. This
36 very early inhibition presents an interest for using this kind of molecules in combination with
37 other antiviral compounds targeting other pathways.
38
39

40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60
61
62
63
64
65
66
67
68
69
70
71
72
73
74
75
76
77
78
79
80
81
82
83
84
85
86
87
88
89
90
91
92
93
94
95
96
97
98
99
100
101
102
103
104
105
106
107
108
109
110
111
112
113
114
115
116
117
118
119
120
121
122
123
124
125
126
127
128
129
130
131
132
133
134
135
136
137
138
139
140
141
142
143
144
145
146
147
148
149
150
151
152
153
154
155
156
157
158
159
160
161
162
163
164
165
166
167
168
169
170
171
172
173
174
175
176
177
178
179
180
181
182
183
184
185
186
187
188
189
190
191
192
193
194
195
196
197
198
199
200
201
202
203
204
205
206
207
208
209
210
211
212
213
214
215
216
217
218
219
220
221
222
223
224
225
226
227
228
229
230
231
232
233
234
235
236
237
238
239
240
241
242
243
244
245
246
247
248
249
250
251
252
253
254
255
256
257
258
259
260
261
262
263
264
265
266
267
268
269
270
271
272
273
274
275
276
277
278
279
280
281
282
283
284
285
286
287
288
289
290
291
292
293
294
295
296
297
298
299
300
301
302
303
304
305
306
307
308
309
310
311
312
313
314
315
316
317
318
319
320
321
322
323
324
325
326
327
328
329
330
331
332
333
334
335
336
337
338
339
340
341
342
343
344
345
346
347
348
349
350
351
352
353
354
355
356
357
358
359
360
361
362
363
364
365
366
367
368
369
370
371
372
373
374
375
376
377
378
379
380
381
382
383
384
385
386
387
388
389
390
391
392
393
394
395
396
397
398
399
400
401
402
403
404
405
406
407
408
409
410
411
412
413
414
415
416
417
418
419
420
421
422
423
424
425
426
427
428
429
430
431
432
433
434
435
436
437
438
439
440
441
442
443
444
445
446
447
448
449
450
451
452
453
454
455
456
457
458
459
460
461
462
463
464
465
466
467
468
469
470
471
472
473
474
475
476
477
478
479
480
481
482
483
484
485
486
487
488
489
490
491
492
493
494
495
496
497
498
499
500
501
502
503
504
505
506
507
508
509
510
511
512
513
514
515
516
517
518
519
520
521
522
523
524
525
526
527
528
529
530
531
532
533
534
535
536
537
538
539
540
541
542
543
544
545
546
547
548
549
550
551
552
553
554
555
556
557
558
559
560
561
562
563
564
565
566
567
568
569
570
571
572
573
574
575
576
577
578
579
580
581
582
583
584
585
586
587
588
589
590
591
592
593
594
595
596
597
598
599
600
601
602
603
604
605
606
607
608
609
610
611
612
613
614
615
616
617
618
619
620
621
622
623
624
625
626
627
628
629
630
631
632
633
634
635
636
637
638
639
640
641
642
643
644
645
646
647
648
649
650
651
652
653
654
655
656
657
658
659
660
661
662
663
664
665
666
667
668
669
670
671
672
673
674
675
676
677
678
679
680
681
682
683
684
685
686
687
688
689
690
691
692
693
694
695
696
697
698
699
700
701
702
703
704
705
706
707
708
709
710
711
712
713
714
715
716
717
718
719
720
721
722
723
724
725
726
727
728
729
730
731
732
733
734
735
736
737
738
739
740
741
742
743
744
745
746
747
748
749
750
751
752
753
754
755
756
757
758
759
760
761
762
763
764
765
766
767
768
769
770
771
772
773
774
775
776
777
778
779
780
781
782
783
784
785
786
787
788
789
790
791
792
793
794
795
796
797
798
799
800
801
802
803
804
805
806
807
808
809
810
811
812
813
814
815
816
817
818
819
820
821
822
823
824
825
826
827
828
829
830
831
832
833
834
835
836
837
838
839
840
841
842
843
844
845
846
847
848
849
850
851
852
853
854
855
856
857
858
859
860
861
862
863
864
865
866
867
868
869
870
871
872
873
874
875
876
877
878
879
880
881
882
883
884
885
886
887
888
889
890
891
892
893
894
895
896
897
898
899
900
901
902
903
904
905
906
907
908
909
910
911
912
913
914
915
916
917
918
919
920
921
922
923
924
925
926
927
928
929
930
931
932
933
934
935
936
937
938
939
940
941
942
943
944
945
946
947
948
949
950
951
952
953
954
955
956
957
958
959
960
961
962
963
964
965
966
967
968
969
970
971
972
973
974
975
976
977
978
979
980
981
982
983
984
985
986
987
988
989
990
991
992
993
994
995
996
997
998
999
1000

1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60
61
62
63
64
65

most efficient new COX-2 compound, with other antiviral compounds. Association of RG193 with quercetin is antagonistic, probably due to their similar chemical structure, and to the inhibition of COX-2 by quercetin previously described ⁹. Surprisingly, the association between RG193 and artesunate is additive, while we could expect a synergistic combination as artesunate targets the NF-kB pathway ²². However, the antimalarian molecule has a short half-life, which could explain the additive relationship ²³. The other associations are synergistic, which is hopeful for an eventual use of specific COX-2 inhibitors with more conventional anti-HCMV treatments in anti-cancer bitherapy, to avoid resistant mutations emerging and reduce concentrations of administered drugs. Although development of COX-2 inhibitors with a flavonoid core is promising, new studies are necessary in order to find new compounds with less toxicity and the same efficacy.

1. Söderberg-Nauclér, C. & Johnsen, J. I. Cytomegalovirus in human brain tumors: Role in pathogenesis and potential treatment options. *World J. Exp. Med.* **5**, 1–10 (2015).
2. Lucas, K. G., Bao, L., Bruggeman, R., Dunham, K. & Specht, C. The detection of CMV pp65 and IE1 in glioblastoma multiforme. *J. Neurooncol.* **103**, 231–238 (2011).
3. Barami, K. Oncomodulatory mechanisms of human cytomegalovirus in gliomas. *J. Clin. Neurosci. Off. J. Neurosurg. Soc. Australas.* **17**, 819–823 (2010).

1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60
61
62
63
64
65

4. Cinatl, J., Vogel, J.-U., Kotchetkov, R. & Wilhelm Doerr, H. Oncomodulatory signals by regulatory proteins encoded by human cytomegalovirus: a novel role for viral infection in tumor progression. *FEMS Microbiol. Rev.* **28**, 59–77 (2004).
5. Vane, J. R., Bakhle, Y. S. & Botting, R. M. Cyclooxygenases 1 and 2. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* **38**, 97–120 (1998).
6. Zhu, H., Cong, J.-P., Yu, D., Bresnahan, W. A. & Shenk, T. E. Inhibition of cyclooxygenase 2 blocks human cytomegalovirus replication. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **99**, 3932–3937 (2002).
7. Speir, E., Yu, Z.-X., Ferrans, V. J., Huang, E.-S. & Epstein, S. E. Aspirin Attenuates Cytomegalovirus Infectivity and Gene Expression Mediated by Cyclooxygenase-2 in Coronary Artery Smooth Muscle Cells. *Circ. Res.* **83**, 210–216 (1998).
8. Nagi, R., Yashoda Devi, B. K., Rakesh, N., Reddy, S. S. & Patil, D. J. Clinical implications of prescribing nonsteroidal anti-inflammatory drugs in oral health care—a review. *Oral Surg. Oral Med. Oral Pathol. Oral Radiol.* **119**, 264–271 (2015).
9. O’Leary, K. A. *et al.* Effect of flavonoids and Vitamin E on cyclooxygenase-2 (COX-2) transcription. *Mutat. Res. Mol. Mech. Mutagen.* **551**, 245–254 (2004).

1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60
61
62
63
64
65

10. Cotin, S. *et al.* Eight flavonoids and their potential as inhibitors of human cytomegalovirus replication. *Antiviral Res.* **96**, 181–186 (2012).
11. Evers, D. L. *et al.* Human cytomegalovirus-inhibitory flavonoids: Studies on antiviral activity and mechanism of action. *Antiviral Res.* **68**, 124–134 (2005).
12. Baryawno, N. *et al.* Detection of human cytomegalovirus in medulloblastomas reveals a potential therapeutic target. *J. Clin. Invest.* **121**, 4043–4055 (2011).
13. Chou, T.-C. Theoretical Basis, Experimental Design, and Computerized Simulation of Synergism and Antagonism in Drug Combination Studies. *Pharmacol. Rev.* **58**, 621–681 (2006).
14. Kaptein, S. J. F. *et al.* The anti-malaria drug artesunate inhibits replication of cytomegalovirus in vitro and in vivo. *Antiviral Res.* **69**, 60–69 (2006).
15. Williams, S. L. *et al.* In Vitro Activities of Benzimidazole d- and l-Ribonucleosides against Herpesviruses. *Antimicrob. Agents Chemother.* **47**, 2186–2192 (2003).
16. Shono, T., Tofilon, P. J., Bruner, J. M., Owolabi, O. & Lang, F. F. Cyclooxygenase-2 expression in human gliomas: prognostic significance and molecular correlations. *Cancer Res.* **61**, 4375–4381 (2001).

1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60
61
62
63
64
65

17. Joki, T. *et al.* Expression of cyclooxygenase 2 (COX-2) in human glioma and in vitro inhibition by a specific COX-2 inhibitor, NS-398. *Cancer Res.* **60**, 4926–4931 (2000).

18. Baryawno, N. *et al.* Tumor-growth-promoting cyclooxygenase-2 prostaglandin E2 pathway provides medulloblastoma therapeutic targets. *Neuro-Oncol.* **10**, 661–674 (2008).

19. Scheurer, M. E., Bondy, M. L., Aldape, K. D., Albrecht, T. & El-Zein, R. Detection of human cytomegalovirus in different histological types of gliomas. *Acta Neuropathol. (Berl.)* **116**, 79–86 (2008).

20. Söderberg-Nauclér, C., Rahbar, A. & Stragliotto, G. Survival in patients with glioblastoma receiving valganciclovir. *N. Engl. J. Med.* **369**, 985–986 (2013).

21. Zarghi, A. & Arfaei, S. Selective COX-2 Inhibitors: A Review of Their Structure-Activity Relationships. *Iran. J. Pharm. Res. IJPR* **10**, 655–683 (2011).

22. Efferth, T. *et al.* The Antiviral Activities of Artemisinin and Artesunate. *Clin. Infect. Dis.* **47**, 804–811 (2008).

23. Flobinus, A. *et al.* Stability and antiviral activity against human cytomegalovirus of artemisinin derivatives. *J. Antimicrob. Chemother.* **dkt346** (2013). doi:10.1093/jac/dkt346

1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60
61
62
63
64
65

24. Mitchell, J. A., Larkin, S. & Williams, T. J. Cyclooxygenase-2: regulation and relevance in inflammation. *Biochem. Pharmacol.* **50**, 1535–1542 (1995).

25. Greenhough, A. *et al.* The COX-2/PGE2 pathway: key roles in the hallmarks of cancer and adaptation to the tumour microenvironment. *Carcinogenesis* **30**, 377–386 (2009).

Table(s)

[Click here to download Table\(s\): tables.docx](#)

Drugs	CC50 on growing fibroblasts (µM)	CC50 on confluent fibroblasts (µM)	CC90 on growing fibroblasts (µM)	CC90 on confluent fibroblasts (µM)
RG998	165± 18	62. 5±1.8	>2000	175
RG1401	41.7±3.8	50±14.14	>2000	95
RG193	1500	185± 3.54	>2000	750
RG194	145± 32	115± 53	>2000	650
Indomethacin	>2000	250	>2000	600
Ganciclovir	>2000	>2000	>2000	>2000

Table n°1: Cytotoxic concentration 50% (CC50) and 90% (CC90) determined for RG998, RG1401, RG193, RG194 indomethacin and ganciclovir in growing and confluent MRC-5. Values are representative of three time experiments.

Drugs	Combination	Parameters			Mean CI	Effect
		Dm (µM)	m	r		
RG 193		15.38 ± 3.6	0.85±0.2	0.96±0.22		
Indo		23.76± 1.57	0.98±0.38	0.96±0.01		
GCV		1.18± 0.15	0.95±0.21	0.97±0.02		
MBV		1.19 ± 0.62	0.65±0.28	0.95 ±0.01		
BAI		4.71 ± 1.6	0.72±0.28	0.87 ±0.14		
QUER		6.3± 1.6	0.73± 0.13	0.97 ± 0.03		
ART		6.34 ± 3	0.9±0.12	0.98±0.01		
	RG 193-GCV				0.92 ± 0.09	Additive
	R193-MBV				0.37 ± 0.03	Synergy
	RG193-BAI				0.73 ± 0.02	Synergy
	RG193-QUER				2.08 ± 0.43	Antagonism
	RG193-ART				0.96 ± 0.43	Additive
	Indo-GCV				0.96 ± 0.03	Additive
	Indo-MBV				0.81 ± 0.12	Synergy
	Indo-BAI				1.74 ± 0.54	Antagonism
	Indo-QUER				2.9 ± 0.43	Antagonism
	Indo-ART				2.17 ± 0.59	Antagonism

Table n°2: Molecules association *in vitro*. Dm (dose–response values median effect (IC50)), *m* (shape of the dose–response curve) and *r* (linear correlation coefficient; *r*=1 indicates perfect fit) for each single drug were derived using Compusyn software (Chou and Martin, 2007). Based on these values, the CI was derived for each drug combination. CI<0.9, synergy; 0.9≤CI<1.1, additive effect; CI>1.1, antagonism. Values are representative of three time experiments. Indo: indomethacin; GCV: ganciclovir; MBV: maribavir; BAI: baicalein; QUER: quercetin; ART: artesunate.

Figure(s)

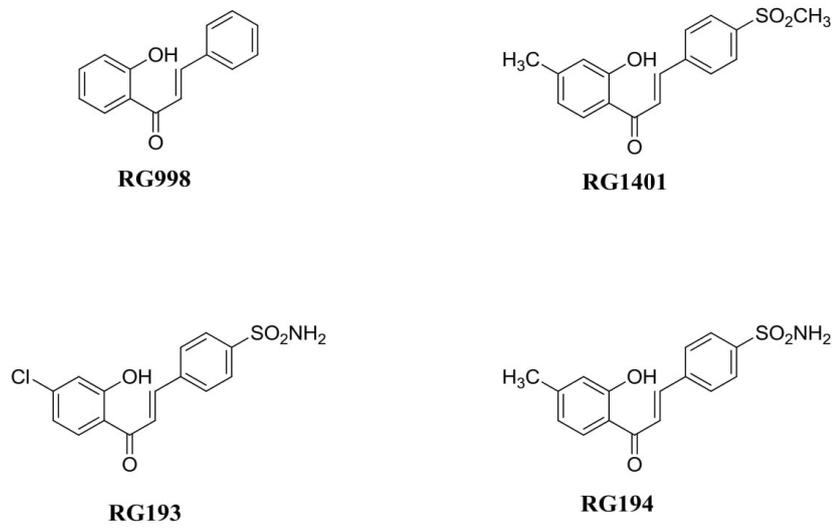


Figure n°1: Chemical structure of tested compounds.

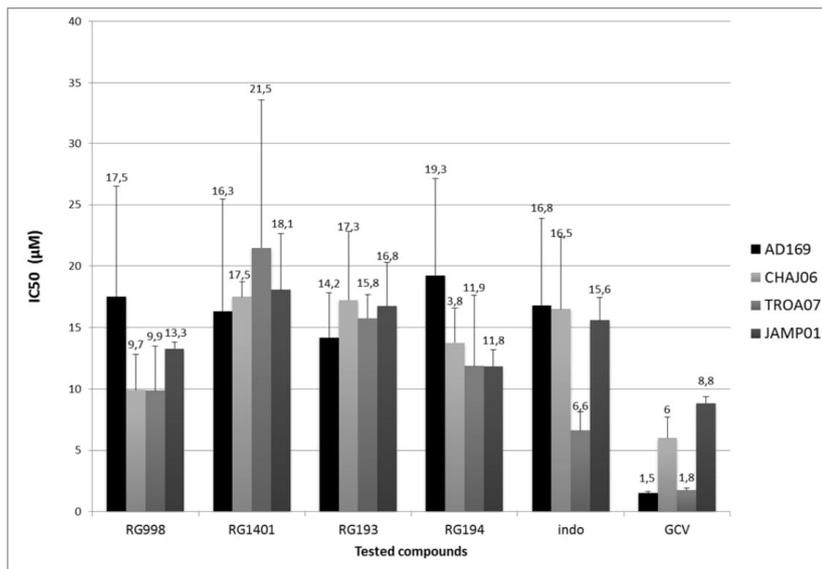


Figure 2: Effect of COX2 inhibitors on clinical strains CHAJ06 (Multidrug resistant strain with UL97 C592G+UL54 N408K G481A mutations), JAMP01 (multidrug resistant strain with UL97 A595S) and TROA07 (congenital naïve). Inhibitory concentration 50% (IC50) were represented over error bars, and representative of 3 times experiments.

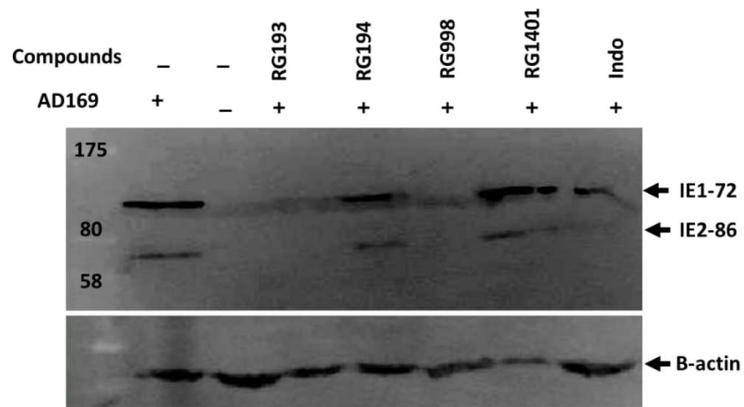


Figure n°3: HCMV immediate-early protein production in presence or absence of the different COX inhibitors. +: presence of compound/AD169; -: absence of compound/AD169; indo: indomethacin

3. Conclusion

Le CMVH est un herpèsvirus qui pourrait être impliqué dans des formes de cancers tels les glioblastomes et les médulloblastomes. Certains auteurs ont montré que l'inhibition du CMVH par un traitement antiviral permettrait une réduction de la masse tumorale. Parallèlement, l'inhibition de l'enzyme COX-2 impliquée dans les processus inflammatoires semble être une voie thérapeutique contre l'infection à CMVH dans le cas de ces tumeurs.

Nous avons testés des inhibiteurs de cette enzyme développés récemment par l'équipe EA1069 de Limoges. Ces composés comportent un squelette flavonoïdique permettant de réduire la toxicité due aux radicaux COX-2. Parmi les composés testés, RG193 présente une toxicité et une efficacité antivirale similaire à l'indométacine, notre anti-inflammatoire non stéroïdien de référence. Les souches cliniques résistantes au ganciclovir que nous avons testées se révèlent être sensibles aux composés, ce qui conforte l'intérêt que peut présenter ce type de molécule.

Nous avons montré que l'association de RG193 avec le maribavir et la baïcaléine est synergique. Cependant, l'augmentation de la concentration en baïcaléine augmente conjointement la mort cellulaire. Si ces composés ne peuvent être administrés à des femmes enceintes pour qui les anti-inflammatoires peuvent avoir des conséquences sur le fœtus, ils peuvent être envisagés pour d'autres patients, dans le cadre de bithérapie, afin de diminuer les concentrations nécessaires en antiviraux et diminuer l'émergence de mutations de résistance. Nous avons observé que RG193 inhibe la production des protéines très précoces, mais à ce jour,

il n'est pas possible d'identifier un mécanisme d'action précis. Il serait intéressant de reproduire ces essais en cellules endothéliales, en mesurant en parallèle la transcription de COX-2.

Modèle ex-vivo de l'infection placentaire durant le premier trimestre.

1. Objectifs

Le second axe de recherche a consisté en l'étude de la physiopathologie de l'infection à CMVH et de l'impact des molécules antivirales conventionnelles sur le placenta au cours du premier et troisième trimestre de grossesse, grâce à un modèle de culture d'explant *ex vivo* utilisant une matrice infectieuse de fibroblastes et des éponges de gélatine. Ce modèle de culture d'explants reproduit au plus près les conditions *in vivo*. Dans un premier temps, la mesure de la viabilité et l'infection des explants de premier trimestre de grossesse ont été effectuées ainsi que des premiers essais antiviraux. Le modèle a été ensuite amélioré, et nous a permis de mesurer, via la détermination du profil d'expression des cytokines dans les surnageants de culture et dans les tissus placentaires, l'impact sur les cytokines pro-inflammatoires du CMVH. Ce modèle nous a également permis de tester de nouvelles molécules au potentiel anti-CMVH, dont l'artésunate et le maribavir, qui pourront être potentiellement administrés aux femmes enceintes par leur efficacité antivirale couplée à un faible effet cytotoxique. Une collaboration avec le laboratoire de virologie du Pr W. Rawlinson à Sydney, nous a permis de faire un premier travail de comparaison avec le troisième trimestre de grossesse.

2. Résultats

2.1 Article 1: “Ex vivo model of congenital cytomegalovirus infection and new combination therapies”

Ce premier travail sur le placenta de premier trimestre de grossesse a consisté au développement d'un modèle *ex vivo* permettant l'étude de l'infection virale à CMVH dans les villosités flottantes de placentas. Après vérification de l'efficacité de ces différentes molécules *in vitro*, nous les avons testé dans notre modèle, administrées seules ou en combinaison avec d'autres composés.

L'objectif principal était de rechercher les meilleures combinaisons, à la fois efficaces et avec une toxicité réduite, à partir d'antiviraux utilisés en clinique comme le cidofovir, inhibiteur de l'ADN polymérase virale, l'artésunate, un antipaludéen, et le maribavir, inhibiteur de la kinase virale pUL97. La quercétine et la baïcaléine, deux flavonoïdes étudiés précédemment au laboratoire, (Cotin et al. 2012) ont également été utilisés dans cette étude, afin d'exploiter leur potentiel en bithérapie. Ces différents composés ont d'abord été testés *in vitro*, étape indispensable avant tout essai dans des modèles tissulaires. La viabilité des explants placentaires, via la quantification de l'hormone chorionique gonadotrope humaine (hCG) a également été testée, ainsi que les cinétiques virales de la souche de laboratoire AD169 et la souche clinique P*, provenant d'une infection congénitale. Ce travail est présenté sous forme d'article, accepté dans la revue *Placenta* en novembre 2014



Ex vivo model of congenital cytomegalovirus infection and new combination therapies



L. Morère ^{a, b, d}, D. Andouard ^{a, b, d}, F. Labrousse ^e, F. Saade ^{a, b, d}, C.-A. Calliste ^f,
S. Cotin ^{a, b, d}, Y. Aubard ^g, W.D. Rawlinson ^h, F. Esclaire ⁱ, S. Hantz ^{a, b, c, d}, M.-C. Ploy ^{a, b, c},
S. Alain ^{a, b, c, d, *}

^a University of Limoges, Inserm U1092, Limoges, France

^b INSERM, UMR 1092, Limoges, France

^c CHU Limoges, Laboratoire de Bactériologie-Virologie-Hygiène, Limoges, France

^d French National Reference Center for Cytomegaloviruses, Limoges, France

^e CHU de Limoges, Anatomopathology Department, Limoges, France

^f Faculty of Pharmacy, University of Limoges, LCSN-EA1069, Limoges, France

^g CHU de Limoges, Gynecology-Obstetrics Department, Limoges, France

^h Virology Division, SEALS Microbiology Prince of Wales Hospital and SOMS, BABS UNSW, Randwick, Australia

ⁱ CHU de Limoges, Mother and Child Hospital, Histopathology Department, Limoges, France

ARTICLE INFO

Article history:

Accepted 4 November 2014

Keywords:

Placental infection

Ex vivo model

Flavonoids

Artesunate

Maribavir

ABSTRACT

Introduction: Congenital human cytomegalovirus (HCMV) infection is a major public health problem due to severe sequelae in the fetus and newborns. Currently, due to their toxicity anti-CMV treatments cannot be administered to pregnant women. We thus developed an *ex vivo* model of 1st trimester placental CMV infection to observe the route of infection across the placenta and to test the efficacy of various new drugs targeting different stages of viral cycle.

Methods: After validation of the viability of floating villi explants by ELISA β-HCG, the kinetics of placental infection were determined by immunohistochemistry and qPCR in this *ex vivo* model. Antiviral susceptibility was determined *in vitro* using focus reduction assay and by qPCR in the *ex vivo* model.

Results: The *ex vivo* model showed viral infection in trophoblasts and mesenchymal space of floating villi. *In vitro*, antiviral combinations of maribavir with baicalein or artesunate inhibited viral infection by more than 90%. On the other hand, in *ex vivo* model, infection was reduced by 40% in presence of maribavir and artesunate. The synergistic effect observed *in vitro* was not observed *ex vivo*.

Discussion: This model allowed us to understand the CMV spread in 1st trimester floating villi better and to analyze the anti-CMV efficacy and toxicity of new drugs that could be administered to pregnant women, either alone or in combination.

Conclusions: Such an *ex vivo* model could be applied to other viruses such as rubella or parvovirus B19 and in new drug development.

© 2014 Elsevier Ltd. All rights reserved.

1. Introduction

Human cytomegalovirus (CMV) is a ubiquitous herpesvirus, with seroprevalence ranging from 50 to 80% worldwide. The virus is responsible for the most common congenital viral infection in developed countries. Congenital CMV infection can cause severe

disease in infants including neurosensory deficits, thrombocytopenia, hepatosplenomegaly or death of newborns [1]. Out of 1000 births, seven infants will have congenital CMV infection worldwide, of whom 1 to 2 (0.1%) will have permanent clinical sequelae [2]. Consequences of CMV transmission across the placenta vary depending on the gestational age [3,4]; the risk of sequelae or abortion, being the most important during first trimester [5,6]. Currently, the route of transmission of CMV from mother to fetus is not clearly defined. CMV has been detected in different placental compartments including anchoring and floating villi. Two possible routes of transmission to the fetus have been suggested: either *via* invasive cytotrophoblasts (CT) of anchoring villi within the uterine

* Corresponding author. Centre National de Référence des Cytomégalo-virus, Service de Bactériologie-Virologie-Hygiène, UMR Inserm 1092/FR CNRS 145 GEIST, CHU Dupuytren, 2 Avenue Martin Luther King, 87042 Limoges Cedex, France. Tel.: +33 05 55 05 67 28, +33 05 55 05 67 24; fax: +33 05 55 05 61 25. E-mail address: sophie.alain@unilim.fr (S. Alain).

wall or across floating villi syncytiotrophoblasts (ST) with subsequent infection of the underlying CT [7,8]. CMV has been detected in floating villi, in endothelial cells, fetal macrophages (Hofbauer cells), CT and ST [9–11]. Knowing that ST are in direct contact with the maternal blood, these cells represent a potential site of entry of CMV towards the fetus [9].

Anti-CMV treatments are currently used in immunocompromised patients: ganciclovir (GCV), cidofovir (CDV) and foscarnet (PFA), all inhibit the viral DNA polymerase pUL54. Unfortunately, these molecules are toxic (neutropenia, myelosuppression, renal toxicity), therefore precluding administration to pregnant women [12–15].

The aim of our work was to develop an *ex vivo* model of congenital CMV infection allowing to determine the route of CMV spread in placenta and to test antiviral efficacy of new drugs, Maribavir (MBV), Artesunate (ART), Quercetin (QUER) and Baicalein (BAI). These molecules were selected due to their activities on various viral cycle stages and due to their low toxicity. ART, an antimalarial, QUER and BAI, two flavonoids, previously tested for their anti-CMV potential in our unit, targeted early stages of CMV replication leading to apoptosis in the host cell [16–19] and MBV, a benzimidazole compound, with good oral bioavailability and low toxicity [20] inhibits encapsidation of neovirions [21,22].

2. Materials and methods

2.1. Cell and viral cultures

Monolayer cultures of human embryonic lung fibroblasts (MRC-5 cells, Biomerieux, Lyon, France) were seeded into 48-well plates (5.10^4 cells/well) in culture medium consisting of Dulbecco's Eagle Minimal Essential Medium (DMEM), supplemented with 10% fetal bovine serum, penicillin (1000 IU/ml), gentamicin (0.01 mg) and incubated 5 days at 37 °C in 5% CO₂ until confluence was reached.

CMV laboratory strain AD169 (ATCC, VR-538) and a clinical isolate P⁺, recovered from urine of an untreated newborn with congenital infection, were used. Cell-free virus stocks were obtained by passages on MRC-5 cells up to 80% infection before collecting the supernatant. Virions stocks were stored at –80 °C and titered on MRC-5 cells in foci forming units per ml (PFU/ml).

2.2. Antiviral compounds

CDV (Vistide[®], Gilead, Cambridge, UK), GCV (Cymevean[®], Roche Pharma, Neuilly, France), PFA (Foscavir[®], Astra, Washington, USA) were purchased from providers. MBV (Viropharma Incorporated, Exton, USA) and ART (Janssen, Titusville, USA) were provided by Viropharma and Janssen laboratories respectively, and flavonoids by the LCSN EA1069 research unit (Limoges, France).

2.3. Antiviral plaque reduction assay

MRC-5 confluent cells were infected for 3 h with AD169 or P⁺ strains at a multiplicity of infection (MOI) of 0.01 (DMEM + 10% fetal calf serum (FCS)). The medium was removed and cells were incubated with various drug concentrations for five days. The overlay was then removed and cells were fixed (–20 °C, 20 min) with 90% acetone. The cell monolayers were incubated for 30 min with primary monoclonal

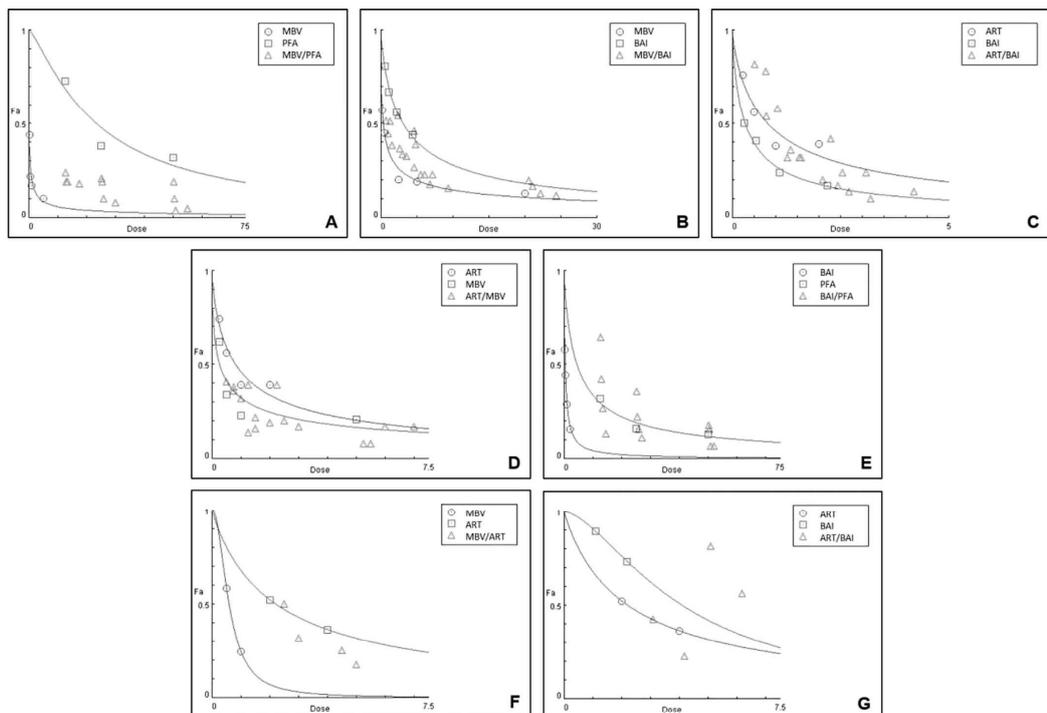


Fig. 1. Dose effect curves of combination therapy *in vitro* and *ex vivo*. (A–E). Curves representing the pharmacological effect of each molecule and combination therapy *in vitro*. A. Association MBV/PFA. B. Association MBV/BAI. C. Association ART/BAI. D. Association ART/MBV. E. Association BAI/PFA. (F–G). Curves representing the pharmacological effect of each molecule and combination therapy *ex vivo*. F. Association MBV/ART. G. Association ART/BAI. Curves were drawn using the software compusyn[®] [23]. Fa, fraction affected; Dose, molecules in μM .

antibody anti-CMV Immediate Early Antigen (I.E.A, IgG1k, clone E13, 1:25 in PBS, Argene, Biomerieux, France), then washed 3 times in PBS and incubated with secondary antibody goat anti-mouse peroxidase (1:100 in PBS, Argene) for 30 min. Foci of infected cells were visualized and counted by 3,3'-Diaminobenzidine (DAB) marker (Dako, Courtbouef, France). 50% inhibitory concentrations IC_{50} were determined and compared to controls without drugs. The pharmacological effect of different drug combinations was evaluated by dose effect curve using Compusyn[®] software [23].

2.4. Cytotoxicity assays

Toxicity of each compound was measured using the CytoTox96[®] Non-Radioactive cytotoxicity assay (Promega, Lyon, France) either in confluent or at growing stage (subconfluent) MRC-5 fibroblasts as previously described [16].

2.5. Ex vivo model

MRC-5 cells were infected with AD169 or P^* strains, at 0.6 to 20 PFU/cell (DMEM – 10% FCS) (Fig. 2). After four days, sponges with placental explants were added and incubated over four days for explant infection (mean infectious titer of supernatant conferred a 0.1 MOI/explant cell). Then, medium was substituted by fresh medium containing antiviral drugs. Control wells without drug were performed. Every four days, explants were fixed in liquid nitrogen for immunohistochemistry and qPCR assays. Supernatant were stored at $-20^{\circ}C$ for β -human chorionic gonadotropin (HCG) concentration measurement. Placentae were collected from voluntary pregnancy terminations (8–14 weeks gestation) and washed (9% saline – penicillin, 1000 IU/ml). Then, floating villi (5 mm² explants) were separated from placenta in a sterile environment by cautious disruption of placental villi with needles or surgical pliers in physiological saline buffer, then cut and placed on 1 cm² sponges (Spongostan dental[™], NewPharma, Liege, Brussels) floating on the culture medium.

2.6. Viral load measurement

CMV DNA extraction. Placental explants were lysed by proteinase K (Ojagen, Hilden, Germany) in 200 mM Tris – 10% Sodium Dodecyl Sulfate at $56^{\circ}C$ until total

degradation. Then, nucleic acids were extracted using the Easymag instrument (Biomerieux) following protocol specific B. qPCR for *Albumin* and *CMV* were performed in triplicate using previously described methods [24,25] with modifications: amplification was performed in Mx3005P-apparatus Stratagene (Agilent Technologies, Massy, France) with Perfecta qPCR SuperMix (Quanta Biosciences, Gaithersburg, USA) following the supplier's instructions. The number of cells present in each explant was deduced from albumin coding sequence quantification, (the mean number of cells in each explant was approximately 10^6) and thus CMV copies/cell were determined.

2.7. β -HCG concentration

β -HCG released by syncytiotrophoblasts was measured in the supernatant using electrochemiluminescent "sandwich" ELISA on magnetic microparticles (Cobas, Roche, Neuilly, France). Results were expressed in mIU/ml/cell.

2.8. Immunohistochemical assays

Frozen explants were cut (5 μ m sections, Leica CM3050S), placed on Superfrost[®] Plus slides (ThermoScientific[™]), fixed in methanol ($-20^{\circ}C$) 20 min at $4^{\circ}C$ and permeabilized with 0.25% Triton X-100 – PBS. Antigen unmasking was performed for 30 min by incubation in medium containing 10% FCS – 0.5% Bovine Serum Albumin (BSA) – PBS. Slides were incubated overnight ($4^{\circ}C$) with primary antibodies (1% FCS – 0.5% BSA – PBS): **Trophoblast staining**, monoclonal rabbit anti-human Cytokeratin 7 (CK7, IgG, clone SP52, 1:100, Abcam, Paris, France); **CMV staining**, monoclonal mouse anti-I.E.A (IgG1k, clone E13, 1:20, Argene) or anti-glycoprotein B (gB, IgG1, clone 2F12, 1:100, Abcam); **Mesenchyme staining**, goat polyclonal anti-vimentin (Vim, IgG, 1:100, Abcam). Tissues were washed 3x5 min (0.05% Tween-20 – PBS). Slides were incubated for 90 min with secondary antibodies (1:200, goat anti-rabbit DyLight 405/594, goat anti-mouse DyLight 488/594 (ThermoScientific[™]) or donkey anti-goat alexa fluor 405 (Abcam) in 0.05% Tween-20 – 5% FCS – PBS in the dark. After washing in PBS, slides were either mounted with Merckoglas[®] (Merck, Fontenay sous bois, France) or nuclei staining DAPI (Sigma Aldrich). In order to check non specific staining, three controls were performed: labeling a non-infected tissue with the anti-CMV antibodies, labeling with secondary antibody alone and labeling with isotype controls by substituting primary antibodies of interest by sera containing immunoglobulin from same species and same isotype as the primary antibodies. Isotype controls mouse IgG1 (for I.E.A and gB), rabbit IgG (for CK7) and goat IgG (for Vim) were purchased from Abcam. Observations were performed by confocal microscopy (Zeiss Axiovert, LSM510).

3. Results

3.1. Efficacy, toxicity of anti-CMV molecules in vitro

IC_{50-90} of AD169 and P^* strains *in vitro* are reported in Table 1. MBV has a strong antiviral activity at low concentrations against AD169 (IC_{50} : $0.41 \mu M \pm 0.22$) and P^* (IC_{50} : $0.69 \mu M \pm 0.16$; IC_{90} : $1.03 \pm 0.11 \mu M$) strains. As concerns new molecules targeting early stages of viral replication such as ART and flavonoids, these molecules were able to inhibit viral strains (IC_{50} : 1.26 ± 0.13 , 0.7 ± 0.23 and 2.59 ± 0.22 for ART, BAI and QUER respectively) by 50%. Moreover, IC_{90} was reached at $3.3 \mu M$ BAI. Interestingly, all of the compounds tested at IC_{50} dose showed little or no toxicity for cells (<8.8% cellular toxicity).

3.2. Efficacy of combination in vitro

In order to detect a possible synergistic effect, we tested efficacy of anti-CMV combination therapies at low concentrations. IC_{50} were summarized in Table 1 and dose–effect curves are represented in Fig. 1.

- GCV/PFA was used as a control because of its known synergistic effect against CMV [26,27]. Indeed, replication decreased by 90% with $2.5 \mu M$ GCV and $12.5 \mu M$ PFA (78% and 25% inhibition, respectively, for each drug alone).
- MBV/PFA. We observed an additive effect of molecules. IC_{50} was reached at $0.25 \mu M$ MBV and $12.5 \mu M$ PFA against AD169 strain.
- MBV/Flavonoids. Adding QUER to MBV did not improve the inhibition of viral load relative to the effectiveness of the single MBV. However, an additive effect was identified for BAI/MBV,

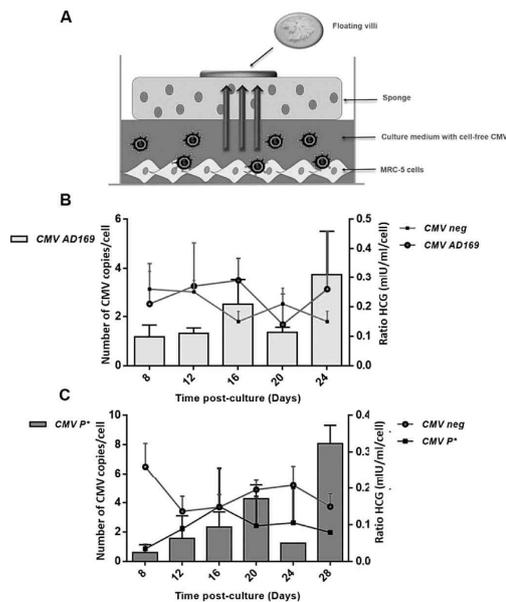


Fig. 2. Ex vivo model, kinetics of CMV infection and tissue viability. A. Schema of ex vivo model of capillarity CMV infection in floating villi of placenta: placental villi were put on a small gel sponge floating on the supernatant of infected MRC-5 fibroblasts and were thus infected by capillarity at a 0.1 MOI. Quantification of AD169 (B. light gray bar) and P^* (C. dark gray bar) CMV copies per cell of floating villi during 24 and 28 days in ex vivo model ($n = 3$) and quantification of HCG released by explants in medium of ex vivo culture (by Elisa testing) in infected or not infected explants ($n = 3$). Beta HCG variations during time were not significant ($p > 0.1$, Wilcoxon-Mann Whitney test) for test B and significant for test C ($p = 0.01$, Wilcoxon-Mann Whitney test).

Table 1

IC₅₀, IC₉₀ *in vitro* and *ex vivo* and cellular toxicity of drugs alone or in combination. IC₅₀ and IC₉₀ were determined *in vitro* in MRC-5 cells with AD169 and P^{*} strains for each molecule (alone or in association, n = 3). IC₅₀ was also measured *ex vivo* 18 days post-infection in floating villi (n = 3/4). Cellular toxicity of molecules, alone or in combination was tested by a cytotoxicity assay in subconfluent and confluent MRC-5 cells (n = 3).

		IC ₅₀ <i>in vitro</i> (μM)		IC ₉₀ <i>in vitro</i> (μM)		IC ₅₀ <i>ex vivo</i> (μM)	% Cellular death	
		Viral strains		Viral strains		Viral strain	Subconfluent cells	Confluent cells
		AD169	P [*]	AD169	P [*]	AD169	/IC ₅₀	
Alone	GCV	1.2 ± 0.78	Nt	7.3 ± 1.62	Nt	Nt	0	0
	PFA	18.52 ± 1.22	Nt	150 ± 23.7	Nt	Nt	0	0
	CDV	0.5 ± 0.01	0.8	Nt	Nt	<1.8*	0	0
	MBV	0.41 ± 0.22	0.69 ± 0.16	23.56 ± 11.56	1.03 ± 0.11	0.41 ± 0.06	0	0
	ART	1.96 ± 1.32	1.26 ± 0.13	Nr	Nr	2.5 ± 0.35	0	<4.59
	BAI	0.36 ± 0.15	0.7 ± 0.23	3.3	4.31 ± 2.97	Nr	0	0
	QUER	4.8 ± 0.81	2.59 ± 0.22	Nr	8.33 ± 0.4	Nt	<8.8	<4.7
Combinations	GCV//PFA	Nt	Nt	2.5//12.5	Nt	Nt	Nt	Nt
	MBV//PFA	0.25//12.5	Nt	0.25//50	Nt	Nt	Nt	Nt
	MBV//ART	0.25//2	0.25//2	5//0.25	1//0.25	0.5//2	<2.6	0
	ART//BAI	1//0.275	Nt	1//2.2	Nt	2//1.1	0	0
	BAI//PFA	0.275//12.5	Nt	1.1//50	Nt	Nt	Nt	Nt
	MBV//BAI	0.25//4.4	1//1.1	20//4.4	1//2.2	Nt	Nt	Nt
	MBV//QUER	Nt	1//2.4	Nt	5//2.4	Nt	Nt	Nt

Nt, not tested. Nr, not reached.* for AD169 and P^{*}.

leading to a reduction of infection of the P^{*} strain over 90% at low concentrations (2.2 μM BAI, 1 μM MBV).

- MBV/ART. In an encouraging way, a synergistic effect was observed at low concentrations. IC₅₀ reached with 0.25 and 2 μM for MBV and ART respectively (P^{*} strain).
- BAI/PFA. Although IC₉₀ was reached for AD169 strain (1.1 μM BAI, 50 μM PFA) an antagonistic effect of molecules was observed at low concentrations of PFA.
- BAI/ART. At 1 and 0.275 μM for ART and BAI respectively, IC₅₀ was reached. Surprisingly, the increase in concentration of the two molecules resulted in an antagonistic effect.

3.3. *Ex vivo* model

The *ex vivo* model allowed us to study the kinetics of CMV infections, the location of the virus during the propagation in floating villi and the efficacy of news antivirals.

The viral load was measured in each explant every four days in parallel to the tissue viability. Cell survival was determined by β-HCG concentration (half-life is 24/48 h) and reported as the number of cells/explant.

3.3.1. Viability of explants

β-HCG production kinetics were measured in non-infected, AD169 and P^{*} infected explants from Day (D)1 to D24/28 (Fig. 2). We observed a persistent and constant β-HCG secretion in supernatant whether in the presence of AD169 strain (B) (0.15–0.3 mIU/ml/cell, p > 0.1) or not, suggesting that AD169 strain does not significantly reduce cell viability of placenta over short term culture. On the other hand, the decrease in the amount of β-HCG released by syncytiotrophoblasts seems related to the virulence of the clinical strain (p = 0.01); while the difference between β-HCG concentration in the two control placentas (without virus) was not significant (p = 0.66).

3.3.2. CMV infection kinetics

The number of CMV copies increased at D8 to 16 (AD169 strain, B) and to D20 (P^{*} strain, C) (Fig. 2). After decline, a secondary increase of viral load occurred at D20 and D24 to reach a peak at D24 and D28 for AD169 and P^{*} strains, respectively. At D28, number of CMV copies/cell was 8 fold higher than D8 (P^{*} strain). Kinetics of released β-HCG suggest that explants of floating villi remains viable during the AD169 infection course.

3.3.3. P^{*} strain propagation in floating villi

Virus spread was followed by immunohistochemistry using cellular and viral markers that target early (I.E.A) and late (gB) stages of viral cycle (Fig. 3). ST were stained by anti-CK7 (red), nuclei by Dapi (yellow) and intermediate filaments by anti-Vim (dark blue). At D10 post-infection, CMV was absent from placental cells (C–D). However, at D16 (E), double staining showed the presence of gB only in the ST. The virus then spread in mesenchymal fibroblasts of placental villi (F–H). At D18, early proteins of virus were colocalized in both ST (G) and mesenchymal space (H). Moreover, the anti-gB antibody was also detected in fibroblasts (F). These data suggest that CMV spreads by capillarity from the underlying fibroblasts to the explants, enters into villi by ST (D16, 18) and then propagates to mesenchyme (D18). Absence of virus detection by immunohistochemistry at D8 and 24 was consistent with the lower viral loads measured by qPCR. Isotype controls and non-infected explants were negative for anti-CMV staining.

3.3.4. Efficacy of drugs

Ex vivo, we tested efficacy of anti-CMV administered alone or in combination at D18, when the peak viral load was observed. We quantified viral load in each explant, in the presence or not of drugs. We defined *ex vivo* IC₅₀ as the concentration drug for which the viral load was reduced by 50% (Table 1).

- CDV. Anti-CMV efficacy of CDV was tested for 24/28 days (Fig. 4). CDV decreased by half the number of CMV copies/cell for AD169 (A) and P^{*} (B) strains, over time. Interestingly, CDV was able to reduce viral load by approximately 5 times at D10 (B) but did not inhibit completely the infection of placental villi.
- MBV. The compound showed significant inhibition of viral growth (Fig. 5A). At 1 μM, viral load was reduced three fold compared to the negative control. *Ex vivo*, IC₅₀ (0.41 ± 0.06 μM) against AD169 strain was similar to *in vitro*.
- ART. In the same manner, ART was effective against AD169 strain (Fig. 5A). *Ex vivo*, IC₅₀ was 2.5 ± 0.35 μM. At 16 μM, viral replication was almost completely inhibited (data not shown).
- BAI. Unlike ART, BAI had no an anti-CMV effect *ex vivo*. In fact, at 1.1–2.2 μM, BAI led to a slight but not significant reduction of viral load (Fig. 5B). IC₅₀ was not reached at the concentrations tested.

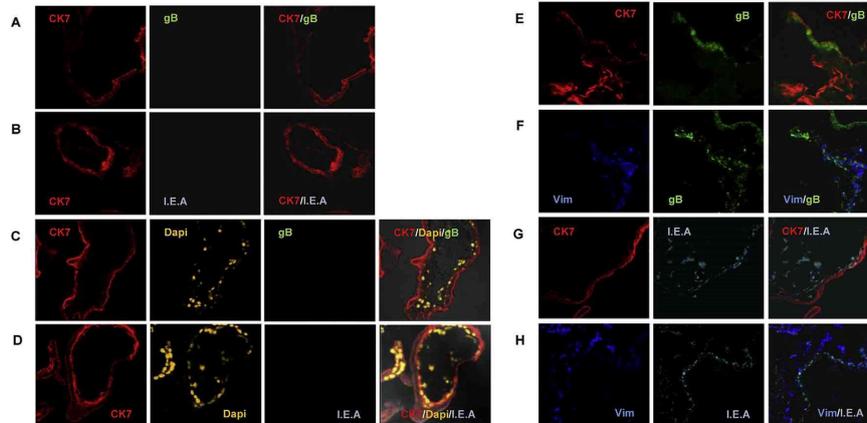


Fig. 3. Spread of CMV P^* strain in floating villi during 18 days in *ex vivo* model. (A–H) Immunostaining of CMV P^* strain in cell of floating villi. Negative controls of CMV markers: gB [late protein, green] (A) and I.E.A [immediate early protein, blue] (B). (C–D) Immunostaining of CMV at day 10 post-infection. (C) Triple labeling of Syncytiotrophoblasts (ST) [CytoKeratin 7, CK7 (red)] – Nuclei [Dapi (yellow)] – CMV [gB (green)]. (D) Triple labeling of Syncytiotrophoblasts [CK7 (red)] – Nuclei [Dapi (yellow)] – CMV [I.E.A (blue)]. (E) Immunostaining of CMV at day 16 post-infection. Double staining of ST [CK7 (red)] – CMV [gB (green)]. (F–H) Immunostaining of CMV at day 18 post-infection. (F) Double staining of mesenchymal cell [Intermediate filaments marker, vimentin, Vim (blue)] – CMV [gB (green)]. (G) Double staining of ST [CK7 (red)] – CMV [I.E.A (blue)]. (H) Double staining of mesenchymal cell [Vim (dark blue)] – CMV [I.E.A (light blue)]. Some colors were modified from original fluorescence to allow simultaneous detection of various antigens.

- MBV/ART. Unexpectedly, association inhibited viral load of AD169 strain (Figs. 1 and 5A) but did not improve the beneficial effect observed by MBV administered alone, unlike the synergistic effect observed *in vitro*.
- ART/BAI. This association had no beneficial effect against infection compared to efficacy of ART administered alone (Figs. 1 and 5B). Surprisingly, increasing the concentration ART at 4 μ M led to a removal of the inhibition of viral replication in the

presence of 1.1 or 2.2 μ M BAI. That antagonistic effect between ART/BAI observed *ex vivo* was concordant with *in vitro* data. ART could be inhibited by BAI at these concentrations.

4. Discussion

Congenital CMV infection is a major public health problem due to severe sequelae in fetus and newborn [1,5,6,29,30] and the absence of available treatments during pregnancy. So far, mechanisms of transplacental transmission from mother to fetus remain to be fully elucidated. Hematogenous infection of the placenta is a crucial step which can be deleterious by both placental damage and viral transmission to the fetus [31,32]. Inhibition of CMV replication in the placenta could thus be an interesting means of preventing sequelae during pregnancy.

To investigate the potential of various drugs to inhibit CMV replication in placenta, we developed an *ex vivo* model of placental explants that mimic *in situ* placental infection. This model preserves cellular and tissue integrity unlike *in vitro* models which use chemical cleavage methods to isolate placental cells, promoting viral permissiveness [8,33].

Ex vivo, AD169 and P^* strains were able to replicate for 24/28 days in explants. The viral cycles were 16 and 20 days respectively for AD169 and P^* strains, similar to the Toledo strain (21 days) [34]. β -HCG concentration in the supernatant allowed us to confirm the viability of placentae in histoculture until day 50 (data not shown), in agreement with the study of Lopez et al. [35].

Immunofluorescence analysis suggests a CMV spread from ST to CT to the mesenchyme of the villi. This could allow further infection of endothelial cells and migration to the fetus *via* umbilical vein, as described in previous studies [7,10,36–38].

After validation of *ex vivo* model, we tested new low toxic drugs that could represent an interest in clinic and particularly during pregnancy. In order to reduce or eradicate CMV in placental cells and decrease the likelihood of emergence of resistance mutations, we opted for therapeutic combinations of new molecules that target two stages of CMV spread in host cells. In fact, the two

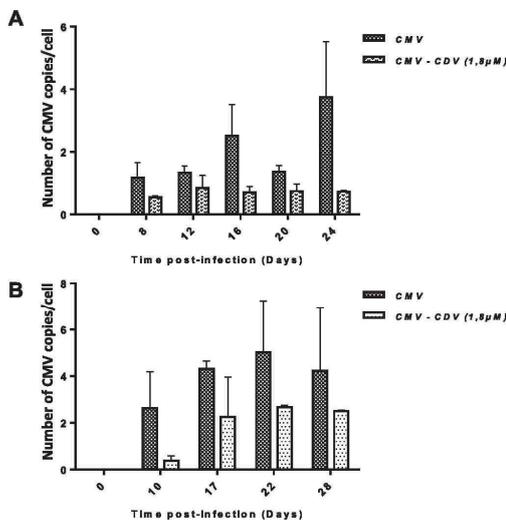


Fig. 4. *Ex vivo* effectiveness of cidofovir. Quantification of AD169 (A) and P^* (B) CMV copies per cell floating villi during 24 and 28 days in *ex vivo* model in the presence or absence of cidofovir (CDV, $n = 3$). $p = 0.05$ (A) and $p > 0.05$ (B), Wilcoxon-Mann Whitney test.

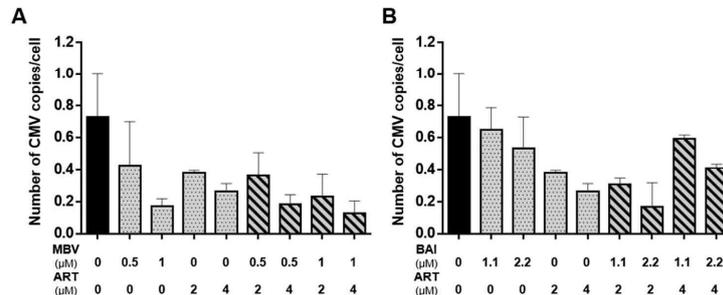


Fig. 5. Ex vivo effectiveness of combination therapeutics. Quantification of AD169 CMV copies per cell floating villi ($n = 4$) measured at 18 days post-infection in *ex vivo* model in presence of artesunate alone (A,B) or in combination with maribavir (A) or baicalain (B). $p < 0.05$, Wilcoxon-Mann Whitney test.

flavonoids, QUER and BAI, and the antimalarial ART interfere with NF κ B signaling by inhibiting phosphorylation of Syk/PLC γ [17], Akt [39] and I κ B- α [40], leading to apoptosis of host cells. MBV, an UL97 kinase inhibitor targets the late step of viral infection, such as the encapsidation of DNA and the release of neovirions in cytoplasm of host cells [21,28,41]. First, plaque assay reduction allowed us to show a strong antiviral efficacy of each molecule against AD169 strain, and then against the clinical congenital strain P^o, in agreement with previous studies [16,19,42,43]. MBV, which has the advantage to be non-toxic and has a good oral bioavailability [20,44], has shown a strong anti-CMV activity (IC₅₀ = 0.41 and 0.69 μ M for AD169 and P^o strains, respectively), in agreement with previous study [45]. However, due to its failure to eradicate the virus, and its possible variation of efficacy amongst various cell-types [28], we have combined MBV with other therapeutic molecules, such as baicalain or artesunate, whose the latter have shown a synergistic potential with MBV *in vitro*. On the other hand, *ex vivo*, antiviral efficacy of this association did not improve the antiviral efficacy observed by each molecule administered alone. Moreover, interestingly, ART/BAI association showed an antagonistic effect *in vitro* and *ex vivo*. Both act on the same target I κ B- α , therefore this effect could result from competitive inhibition between these two molecules.

In conclusion, our model proved efficient for antiviral testing and was reliable for physiopathology studies of CMV infection in the placenta. Further studies on new antiviral compounds are now ongoing with the identification of best candidates for administration during pregnancy against CMV.

Conflict of interest

There is no conflict of interest.

Acknowledgments

We thank Dr Thierry Chianéa for ELISA HCG (Biochemistry service, CHU, Limoges), whole virology service (Center of National Reference Cytomegalovirus, CHU, Limoges), Dr Claire Carrion (UMR7276, Limoges) for confocal microscopy, Dr Almine Abdoulaye Seybou (UMR1061 INRA, Limoges) and Dr Alain Chaunavel (Pathological anatomy service, CHU, Limoges) for immunohistochemical analyzes.

References

- [1] 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(10):663–7.
- [2] Cannon MJ. Congenital cytomegalovirus (CMV) epidemiology and awareness. *J Clin Virol* 2009;46(Suppl. 4):S6–10.
- [3] Enders G, Bader U, Lindemann L, Schallast G, Daiminger A. Prenatal diagnosis of congenital cytomegalovirus infection in 189 pregnancies with known outcome. *Prenat Diagn* 2001;21(5):362–77.
- [4] Revello MG, Lilleri D, Zavattoni M, Furione M, Middeldorp J, Gerna G. Prenatal diagnosis of congenital human cytomegalovirus infection in amniotic fluid by nucleic acid sequence-based amplification assay. *J Clin Microbiol* 2003;41(4):1772–4.
- [5] Soper DE. Congenital cytomegalovirus infection: an obstetrician's point of view. *Clin Infect Dis* 2013;57(Suppl. 4):S171–3.
- [6] Boppana SB, Ross SA, Fowler KB. Congenital cytomegalovirus infection: clinical outcome. *Clin Infect Dis* 2013;57(Suppl. 4):S178–81.
- [7] Fisher S, Genbacev O, Maidji E, Pereira L. Human cytomegalovirus infection of placental cytotrophoblasts in vitro and in utero: implications for transmission and pathogenesis. *J Virology* 2000;74(15):6808–20.
- [8] Hemmings DG, Kilani R, Nykiforuk C, Preiksaitis J, Guilbert LJ. Permissive cytomegalovirus infection of primary villous term and first trimester trophoblasts. *J Virology* 1998;72(6):4970–9.
- [9] Becroft DM. Prenatal cytomegalovirus infection: epidemiology, pathology and pathogenesis. *Perspect Pediatr Pathology* 1981;6:203–41.
- [10] Sinzger C, Muntefering H, Loning T, Stoss H, Plachter B, Jahn G. Cell types infected in human cytomegalovirus placentitis identified by immunohistochemical double staining. *Virchows Arch* 1993;423(4):249–56.
- [11] Hamilton ST, Scott G, Naing Z, Iwasenko J, Hall B, Graf N, et al. Human cytomegalovirus-induced cytokine changes in the placenta with implications for adverse pregnancy outcomes. *PLoS One* 2012;7(12):e52899.
- [12] Crumpacker CS. Mechanism of action of foscarnet against viral polymerases. *Am J Med* 1992;92(2A):35–7S.
- [13] Wagstaff AJ, Foscarnet Bryson HM. A reappraisal of its antiviral activity, pharmacokinetic properties and therapeutic use in immunocompromised patients with viral infections. *Drugs* 1994;48(2):199–226.
- [14] Jacobson MA. Ganciclovir therapy for severe cytomegalovirus infection in immunocompetent patients. *Clin Infect Dis* 1997;25(6):1487–8.
- [15] Safran S, Cherrington J, Jaffe HS. Clinical uses of didanosine. *Rev Med Virol* 1997;7(3):145–56.
- [16] Cotin S, Calliste CA, Mazon MC, Hantz S, Duroux JL, Rawlinson WD, et al. Eight flavonoids and their potential as inhibitors of human cytomegalovirus replication. *Antivir Res* 2012;96(2):181–6.
- [17] Cheng C, Ho WE, Goh FY, Guan SP, Kong LR, Lai WQ, et al. Anti-malarial drug artesunate attenuates experimental allergic asthma via inhibition of the phosphoinositide 3-kinase/Akt pathway. *PLoS One* 2011;6(6):e20932.
- [18] Walker EH, Pacold ME, Perisic O, Stephens L, Hawkins PT, Wymann MP, et al. Structural determinants of phosphoinositide 3-kinase inhibition by wortmannin, LY294002, quercetin, myricetin, and staurosporine. *Mol Cell* 2000;6(4):909–19.
- [19] Evers DL, Chao CF, Wang X, Zhang Z, Huang SM, Huang ES. Human cytomegalovirus-inhibitory flavonoids: studies on antiviral activity and mechanism of action. *Antivir Res* 2005;68(3):124–34.
- [20] Swan SK, Smith WB, Marbury TC, Schumacher M, Dougherty C, Mico BA, et al. Pharmacokinetics of maribavir, a novel oral anticytomegalovirus agent, in subjects with varying degrees of renal impairment. *J Clin Pharmacol* 2007;47(2):209–17.
- [21] Biron KK. Antiviral drugs for cytomegalovirus diseases. *Antivir Res* 2006;71(2–3):154–63.
- [22] Wolf DG, Yaniv I, Ashkenazi S, Honigman A. Emergence of multiple human cytomegalovirus ganciclovir-resistant mutants with deletions and substitutions within the UL97 gene in a patient with severe combined immunodeficiency. *Antimicrob Agents Chemother* 2001;45(2):593–5.
- [23] Chou TC. Theoretical basis, experimental design, and computerized simulation of synergism and antagonism in drug combination studies. *Pharmacol Rev* 2006;58(3):621–81.

- [24] Mengelle C, Pasquier C, Rostaing L, Sandres-Saune K, Puel J, Berges L, et al. Quantitation of human cytomegalovirus in recipients of solid organ transplants by real-time quantitative PCR and pp65 antigenemia. *J Med Virology* 2003;69(2):225–31.
- [25] Mazet-Wagner AA, Baclet MC, Loustaud-Ratti V, Denis F, Alain S. Real-time PCR quantitation of hepatitis B virus total DNA and covalently closed circular DNA in peripheral blood mononuclear cells from hepatitis B virus-infected patients. *J Virological Methods* 2006;138(1–2):70–9.
- [26] Evers DL, Komazin G, Shin D, Hwang DD, Townsend LB, Drach JC. Interactions among antiviral drugs acting late in the replication cycle of human cytomegalovirus. *Antivir Res* 2002;56(1):61–72.
- [27] Manischewitz JF, Quinnan Jr GV, Lane HC, Wittek AE. Synergistic effect of ganciclovir and foscarnet on cytomegalovirus replication in vitro. *Antimicrob Agents Chemother* 1990;34(2):373–5.
- [28] Chou S, Van Wechel LC, Marousek GI. Effect of cell culture conditions on the anticytomegalovirus activity of maribavir. *Antimicrob Agents Chemother* 2006;50(7):2557–9.
- [29] Stagno S, Pass RF, Cloud G, Britt WJ, Henderson RE, Walton PD, et al. Primary cytomegalovirus infection in pregnancy. Incidence, transmission to fetus, and clinical outcome. *JAMA* 1986;256(14):1904–8.
- [30] Ramsay ME, Miller E, Peckham CS. Outcome of confirmed symptomatic congenital cytomegalovirus infection. *Archives Dis Child* 1991;66(9):1068–9.
- [31] Sachdev R, Nuovo GJ, Kaplan C, Greco MA. In situ hybridization analysis for cytomegalovirus in chronic villitis. *Pediatr Pathology/Affiliated Int Paediatr Pathology Assoc* 1990;10(6):909–17.
- [32] Nakamura Y, Sakuma S, Ohta Y, Kawano K, Hashimoto T. Detection of the human cytomegalovirus gene in placental chronic villitis by polymerase chain reaction. *Hum Pathol* 1994;25(8):815–8.
- [33] Halwachs-Baumann G, Wilders-Truschnig M, Desoye G, Hahn T, Kiesel L, Klingel K, et al. Human trophoblast cells are permissive to the complete replicative cycle of human cytomegalovirus. *J Virology* 1998;72(9):7598–602.
- [34] Gabrielli L, Losi L, Varani S, Lazzarotto T, Eusebi V, Landini MP. Complete replication of human cytomegalovirus in explants of first trimester human placenta. *J Med Virology* 2001;64(4):499–504.
- [35] Lopez H, Benard M, Saint-Aubert E, Baron M, Martin H, Al Saati T, et al. Novel model of placental tissue explants infected by cytomegalovirus reveals different permissiveness in early and term placenta and inhibition of isoform 2,3-dioxygenase activity. *Placenta* 2011;32(7):522–30.
- [36] Muhlemann K, Miller RK, Metlay L, Menegus MA. Cytomegalovirus infection of the human placenta: an immunocytochemical study. *Hum Pathol* 1992;23(11):1234–7.
- [37] Pereira L, Maidji E, McDonagh S, Genbacev O, Fisher S. Human cytomegalovirus transmission from the uterus to the placenta correlates with the presence of pathogenic bacteria and maternal immunity. *J Virology* 2003;77(24):13301–14.
- [38] Maidji E, McDonagh S, Genbacev O, Tabata T, Pereira L. Maternal antibodies enhance or prevent cytomegalovirus infection in the placenta by neonatal Fc receptor-mediated transcytosis. *Am J Pathology* 2006;168(4):1210–26.
- [39] Xu H, He Y, Yang X, Liang L, Zhan Z, Ye Y, et al. Anti-malarial agent artesunate inhibits TNF-alpha-induced production of proinflammatory cytokines via inhibition of NF-kappaB and PI3 kinase/Akt signal pathway in human rheumatoid arthritis fibroblast-like synoviocytes. *Rheumatol Oxf Engl* 2007;46(6):920–6.
- [40] Chuang CC, Martinez K, Xie G, Kennedy A, Bumrungsri A, Overman A, et al. Quercetin is equally or more effective than resveratrol in attenuating tumor necrosis factor-(alpha)-mediated inflammation and insulin resistance in primary human adipocytes. *Am J Clin Nutr* 2010;92(6):1511–21.
- [41] Krosky PM, Baek MC, Coen DM. The human cytomegalovirus UL97 protein kinase, an antiviral drug target, is required at the stage of nuclear egress. *J Virology* 2003;77(2):905–14.
- [42] Efferth T, Romero MR, Wolf DG, Stamminger T, Marin JJ, Marschall M. The antiviral activities of artemisinin and artesunate. *Clin Infect Dis* 2008;47(6):804–11.
- [43] Kaptein SJ, Efferth T, Leis M, Rechter S, Auerochs S, Kalmer M, et al. The anti-malaria drug artesunate inhibits replication of cytomegalovirus in vitro and in vivo. *Antivir Res* 2006;69(2):60–9.
- [44] Alain S, Revest M, Veyer D, Essig M, Rerolles JP, Rawlinson W, et al. Maribavir use in practice for cytomegalovirus infection in French transplantation centers. *Transplant Proc* 2013;45(4):1603–7.
- [45] Lurain NS, Chou S. Antiviral drug resistance of human cytomegalovirus. *Clin Microbiol Rev* 2010;23(4):689–712.

La fréquence de transmission du CMVH au fœtus est moins élevée lors du premier trimestre de grossesse, mais les conséquences sur la santé du fœtus sont plus graves que lorsque la transmission s'effectue lors des deux autres trimestres de grossesse (Revello and Gerna, 2004). Nous nous sommes donc intéressés aux évènements se déroulant lors des premières semaines de grossesse, en développant un modèle d'infection dans les explants placentaires de premier trimestre en *ex vivo*. Ce modèle a permis d'étudier la cinétique de l'infection de deux souches humaines de CMVH, la souche de référence AD169 et une souche clinique d'infection congénitale P*. Ces deux souches infectent les villosités flottantes de placentas de 1er trimestre de grossesse et sont détectées par immunohistochimie. Ce modèle conforte la voie de transmission du virus de la mère au fœtus proposée par Maidji et al. (Maidji et al., 2006). Nous avons pu ainsi étudier l'efficacité de nouvelles molécules antivirales, seules ou en combinaison, dans le modèle *in vitro* et *ex vivo*. Le cidofovir, administré à une concentration de 1.8µM, est efficace sur la souche AD169 et P*, dont il réduit la charge virale d'un facteur 5 à 10. L'artésunate, le maribavir, la baïcaléine et la quercétine ont montré un fort potentiel antiviral contre la souche de laboratoire AD169. De façon intéressante, l'association du maribavir et de l'artésunate *ex vivo* ne présente pas de synergie, contrairement à ce qui est observé *in vitro*. Un effet antagoniste de l'association de l'artésunate de la baïcaléine est observé dans les explants, concordant avec les résultats obtenus en culture de fibroblastes.

2.2 Comparaison de l'impact de traitements antiviraux sur l'expression de cytokines dans des modèles de culture *ex vivo* de placenta de premier et troisième trimestre: résultats préliminaires.

2.2.1 Introduction

Nous avons pu établir au laboratoire un modèle de culture d'explants placentaire de premier trimestre. Ce modèle utilisant des éponges de gélatine a été mis au point pour l'étude de l'infection lors du premier et du troisième trimestre de grossesse, dans des conditions proches des évènements *in vivo*. Nous avons ainsi pu démontrer la viabilité des explants et l'efficacité antivirale de diverses molécules. Cependant, le premier modèle développé dans notre laboratoire demandait à être amélioré: en effet, bien que l'effet des antiviraux ait pu être observé, la présence de la couche de fibroblastes matrice pouvait influencer les résultats, ainsi, il était difficile de dire si la charge virale observée dans les tissus était due à la réinfection virale par la matrice fibroblastique ou par l'infection virale à l'intérieur même du placenta.

Nous avons donc modifié ce premier modèle en ce sens et nous sommes intéressés particulièrement à l'impact de l'infection à CMVH sur l'expression des cytokines dans le premier trimestre et le troisième trimestre de grossesse. En effet, la grossesse est caractérisée par des changements de la balance Th1/Th2, et le virus contribue à modifier cette balance. L'étude menée par Scott en 2012 montre que le CMVH induit un penchement de cette balance en Th1 (pro-inflammatoire) dans le liquide amniotique durant le deuxième trimestre de grossesse (Scott et al., 2012). Peu de travaux ont été menés sur l'impact du CMVH sur les cytokines dans des modèles placentaires *ex-vivo*, et principalement sur le second ou troisième trimestre. L'expression des cytokines pro-inflammatoires TNF- α et MCP-1 est élevée dans les

placentas de troisième trimestre infectés, ce qui est confirmé au bout de 12 jours au sein d'un modèle de culture *ex-vivo* d'explants placentaires de troisième trimestre de grossesse. (Hamilton et al, 2012). L'étude menée par Tabata et al a démontré l'impact de l'infection à CMVH sur les facteurs de croissance VEGF, qui, étant augmentés de façon significative dans les explants, induisent une prolifération anormale de cellules endothéliales lymphatiques (Tabata et al., 2012).

Ce travail de comparaison a été mené en collaboration au sein de l'équipe dirigée par le Pr William Rawlinson, à Sydney, dans le cadre des travaux de thèse financés en partie par le grant n° APP1045989 validé par le National Health & Medical Research Council du gouvernement australien. Ces premiers essais ont été réalisés avec la souche de laboratoire AD169 ATCC V538, commune aux deux laboratoires. Bien qu'il ne s'agisse pas d'une souche clinique, elle peut infecter les explants placentaires de premier trimestre (Morère et al., 2015) et de troisième trimestre (Hamilton et al., 2012).

Nous avons ainsi pu mesurer l'expression protéique de 27 cytokines excrétées dans le surnageant des cultures d'explants placentaires afin d'établir une première comparaison de l'impact du CMVH entre le premier et le troisième trimestre de grossesse. Nous nous sommes également intéressés à l'impact de l'infection virale sur les niveaux d'expression des ARN messagers des cytokines pro-inflammatoires MCP-1, IP-10 et TNF- α dans les explants placentaires. Nous avons également étudié l'impact de molécules antivirales sur ces mêmes cytokines inflammatoires. Nous avons ainsi testé le ganciclovir et le foscarnet en tant qu'antiviraux de référence, et l'artésunate et le maribavir comme nouveaux

composés, pour leur faible toxicité. L'artésunate étant une molécule peu stable (Schnepf et al., 2011), nous avons donc effectué une comparaison dans les placentas de premier trimestre en changeant régulièrement ou non le milieu.

2.2.2 Matériels et méthodes.

2.2.2.1 Virus, lignées cellulaires

Les cellules HFF (Human Foreskin Fibroblasts) et les MRC-5 (fibroblastes pulmonaires fœtaux) ont été cultivées dans du milieu DMEM, tandis que les TEV-1 (trophoblastes extravilleux de premier trimestre) ont été cultivés dans du milieu DMEM/F12 supplémentés en sérum fœtal de veau (SVF) et antibiotiques (voir annexe n°1). Les cellules ont été infectées à une MOI de 0.1 avec la souche AD169 ATCC V538 à partir de stocks de surnageants issus de culture virale.

2.2.2.2 Préparation et culture des explants placentaires

Les placentas de premier trimestre proviennent d'interruption volontaire de grossesse (8 à 14 semaines d'aménorrhée), après obtention du consentement des patientes. Les placentas de troisième trimestre de grossesse proviennent d'accouchement par césarienne. Dans les deux cas, les trophoblastes sont nettoyés par plusieurs passages dans une solution saline 0.9% complétée avec des antibiotiques et les villosités sont séparées en explants d'environ 3 à 5 mm². Les explants sont ensuite disposés sur des éponges de gélatine (Spongostan Dental™, Johnson & Johnson, USA) et laissés 5 jours dans une plaque 48 puits contenant des cellules MRC-5 infectées à une MOI de 0.1. Au bout de 5 jours, les éponges et les explants sont déplacés dans une plaque 48 puits contenant du MEM supplémenté en

SVF et antibiotiques, avec ou sans antiviraux. Pour chaque condition, trois explants sont récoltés à J+4, J+7, J+10 et J+13.

2.2.2.3 Composés

Le ganciclovir (GCV) (Cymevan®, Roche Pharma, Neuilly, France), et le foscarnet (PFA) (Foscavir®, Astra, Washington, USA), le maribavir (MBV) (Viropharma Incorporated, Exton, USA), et l'artésunate (ART) (Janssen, Titusville, USA) ont été reconstitués dans de l'eau stérile excepté l'artésunate qui a été reconstitué dans un mélange constitué de 50% d'eau et 50% de DMSO. Tous les composés ont été ensuite répartis en aliquotes conservés à -80°C. Pour les essais antiviraux en culture cellulaire et les essais sur les explants placentaires, les composés ont été dilués dans du milieu de culture à des concentrations de 0,1x CI50, 1x CI50 et 10x CI50. Sur le modèle *ex-vivo* de premier trimestre, l'artésunate a été testé dans deux conditions différentes: le milieu était soit changé tous les deux jours et renouvelé avec du milieu frais contenant l'antiviral, soit laissé dans les puits tout au long des 13 jours.

2.2.2.4 Mesure de la charge virale et de l'expression des cytokines pro-inflammatoires

Les explants de placenta ont été lysés à la protéinase K (Qiagen, Hilden, Germany) dans 200 mM Tris -10% Sodium Dodecyl Sulfate (SDS) à +56°C jusqu'à dégradation totale du tissu, puis extraits sur automate Easymag (Biomérieux, Marcy-l'Etoile, France) avec le protocole spécifique B pour les échantillons de premier trimestre ou en utilisant le kit d'extraction High Pure Viral Nucleic Acid Kit (Roche Diagnostics, Mannheim, Allemagne) pour le troisième trimestre.

La mesure de la charge virale dans les explants a été réalisée comme décrite précédemment (Morère et al., 2015). Pour la mesure des ARNms cytokiniques, les échantillons sont traités à la DNase (Ambion® DNA-free™ DNase, Life technologies), diluée au 1/10^{ème}, pendant 30 min à 37°C. Après inactivation pendant 2 min de la DNase par le mix d'inactivation, les échantillons sont centrifugés 1,5 minutes à 10rpm, et le surnageant contenant l'ARN est récupéré. La quantité d'ARN a été ensuite quantifiée par spectrophotométrie (Automate Nanodrop® spectrophotometer ND-1000) et les échantillons ont été dilués dans de l'eau (*nuclease free*) afin d'obtenir une concentration en ARN total à 10ng/μL.

La synthèse des ADNc a été réalisée avec le kit Iscript™ de BIORAD selon les instructions du fabricant. La quantité d'ADNc a été quantifiée avec le kit SYBR® FAST qPCR kit (KAPABIOSYSTEMS), selon les instructions du fabricant. Nous avons utilisés les amorces et les cycles d'amplification décrits dans le tableau en annexe n°2.

2.2.2.5 Mesure de l'expression des cytokines dans les surnageants de culture

Les concentrations de 27 cytokines ont été mesurées sur 48 surnageants provenant de cultures d'explants de placentas de premier ou de troisième trimestre, infectés par l'AD169 ou non infectés (n=12 pour chaque condition), en utilisant le kit multiplex Bio-Plex Human 27-Plex Cytokine Panel and Reagent Kits (Bio-Rad), selon les instructions du fournisseur. Ce kit permet de mesurer les taux des cytokines suivantes: l'interféron γ (IFN-γ), l'interleukine 1b (IL-1b), l'interleukine 1 receptor antagonist (IL-1Ra), les interleukines 2, 4, 5, 6, 7, 8, 10, 12, 13, 15, 17 et le facteur de nécrose tumorale TNF-α. Le kit permet également la mesure des chimiokines CXCL8, CXCL10, CCL2, CCL3, CCL4, CCL5 et CCL11 ainsi que des facteurs de

croissance suivants: le facteur de croissance des fibroblastes (FGF), les facteurs stimulant les granulocytes (G-CSF) et stimulant les granulocytes-macrophages (GM-CSF), le facteur de croissance dérivé des plaquettes (PDGF-bb), et le facteur de croissance de l'endothélium vasculaire (VEGF).

2.2.2.6 Méthodes statistiques

Les surnageants des explants placentaires étant des échantillons issus de mêmes placentas, nous étudions la significativité de la différence des cytokines excrétées via un test de Student sur échantillons appariés. La significativité de l'impact des antiviraux sur les charges virales et la quantification des ARNms a été étudiée via le test statistique de Mann-Whitney sur des échantillons non appariés. Pour les deux tests, le seuil est limité à $p \leq 0.05$.

2.2.3 Résultats

2.2.3.1 Impact des antiviraux sur l'infection à CMVH *in vitro*

Une première étape avant l'utilisation de nouveaux composés est leur test *in vitro* sur des lignées cellulaires. Pour ce faire nous avons travaillé sur deux lignées de fibroblastes humains: les HFF et les MRC-5, ainsi qu'une lignée trophoblastique, les TEV-1. Nous avons ainsi testé les différents composés à des concentrations d'un dixième de la CI50, d'une fois la CI50 et de dix fois la CI50. L'impact de ces antiviraux sur les fibroblastes a été déterminé par comptage des foyers d'infection, les résultats sont représentés figure n° 37 et 38.

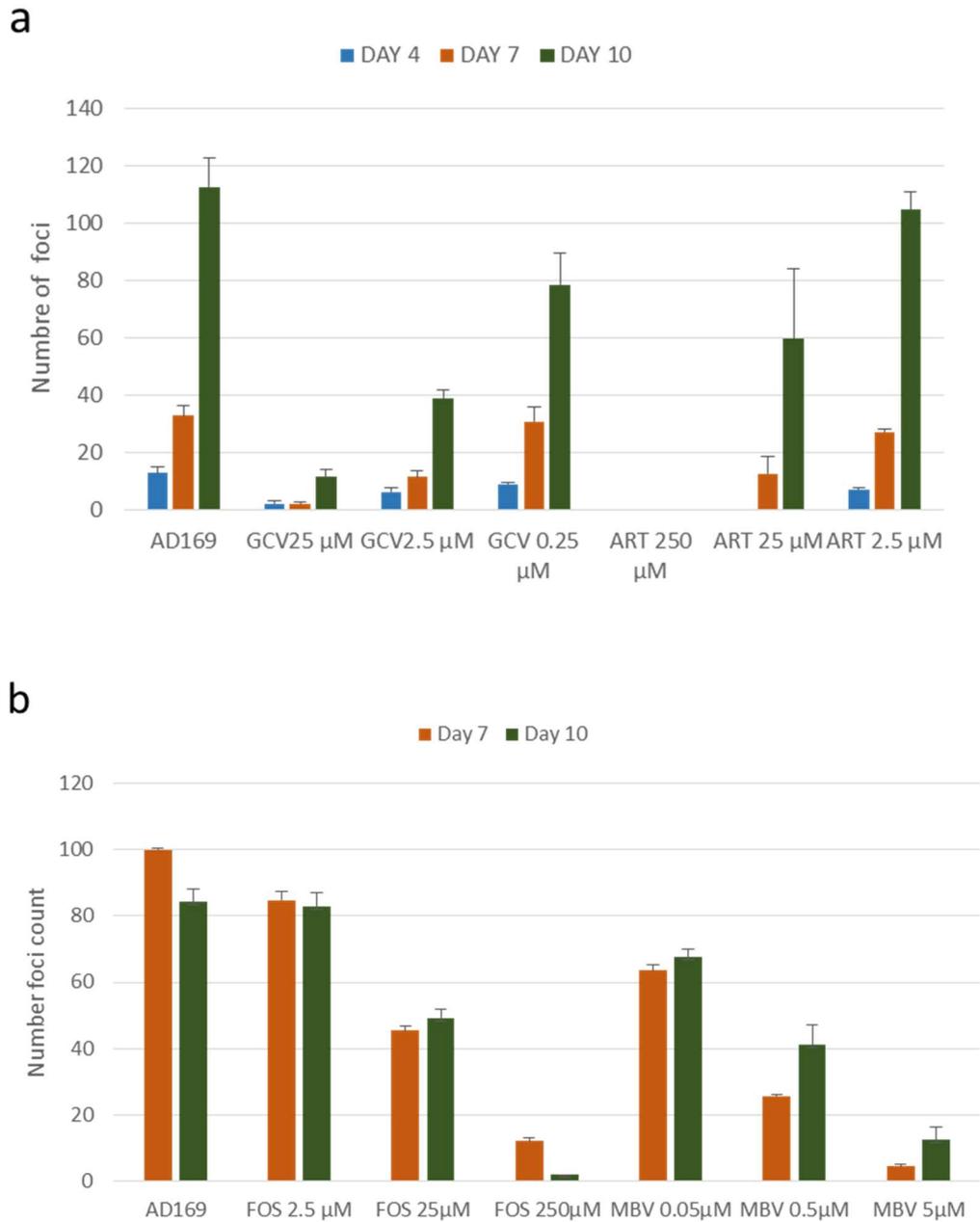


Figure n° 37: Impact des antiviraux sur l'infection à CMVH dans les MRC-5. a) impact du ganciclovir (GCV) et de l'artésunate (ART) à J4, J7 et J10. b) impact du foscarnet (FOS) et du maribavir (MBV) à J7 et J10

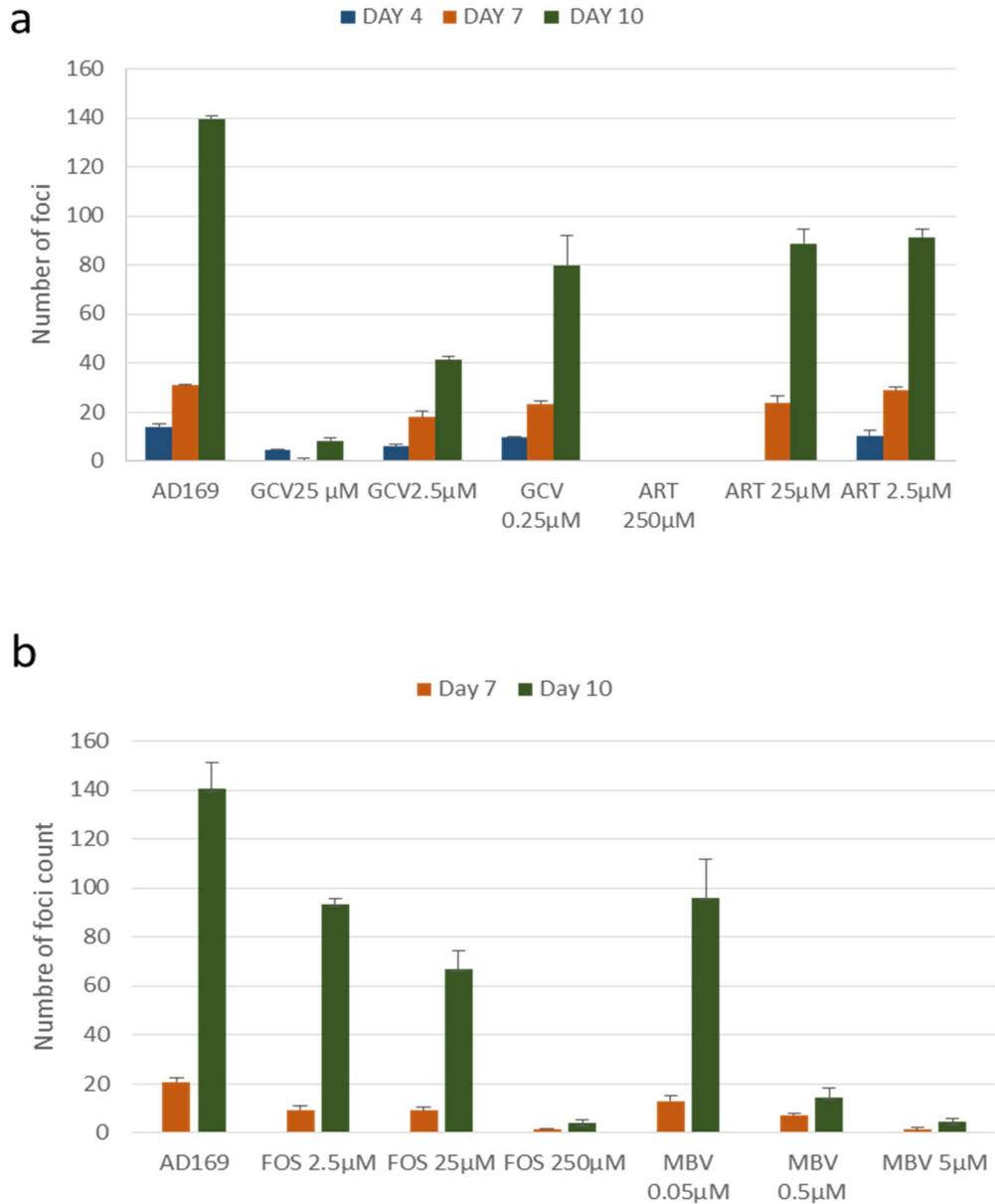


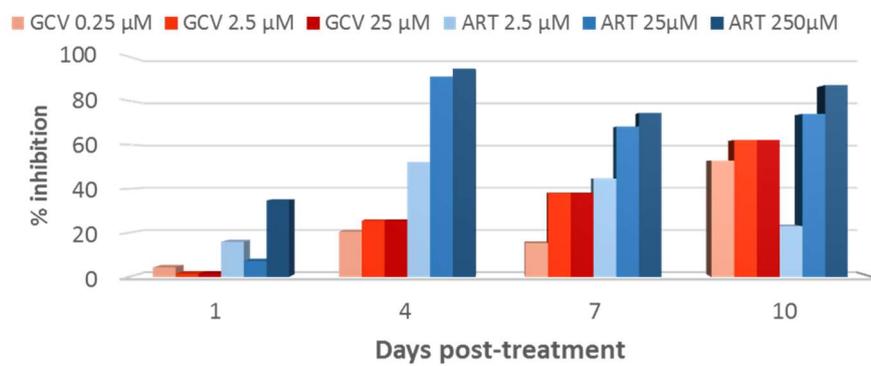
Figure n° 38: Impact des antiviraux sur l'infection à CMVH dans les HFFs. a) impact du ganciclovir (GCV) et de l'artésunate (ART) à J4, J7 et J10. b) impact du foscarnet (FOS) et du maribavir (MBV) à J7 et J10

Nous observons une diminution du nombre de foyers d'infection dans les puits contenant les antiviraux par rapport au témoin AD169. Aucun foyer n'est compté dans les puits contenant de l'artésunate à une concentration de 250 μ M.

Les foyers d'infection constitués de cellules ballonnées ne sont pas visibles dans les cellules trophoblastiques. Afin de déterminer l'impact des antiviraux sur la réplication virale, nous avons marqué les protéines virales IEA et pp65 par immunofluorescence et ainsi déterminé leur inhibition par rapport au témoin AD169 sans antiviraux. Les résultats de l'impact des antiviraux sur l'expression de ces protéines à J+4, J+7 et J+13 post infection sont représentés dans la figure n°39.

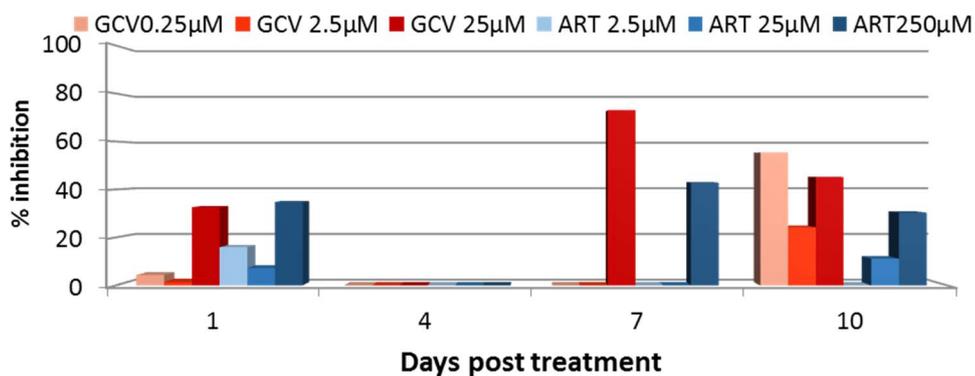
a

IEA inhibition in TEV-1 cells

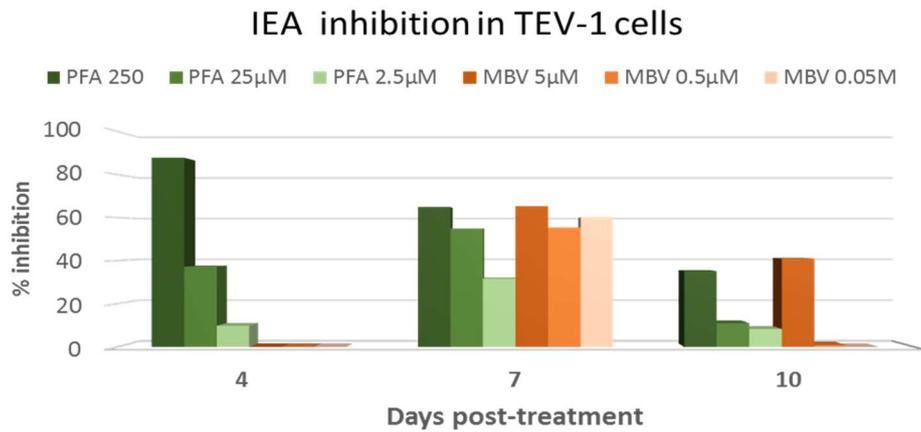


b

pp65 inhibition in TEV-1 cells



c



d

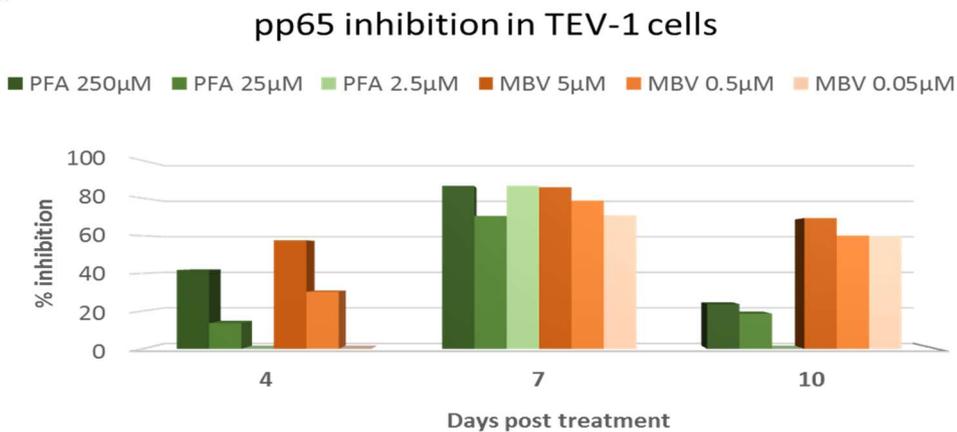


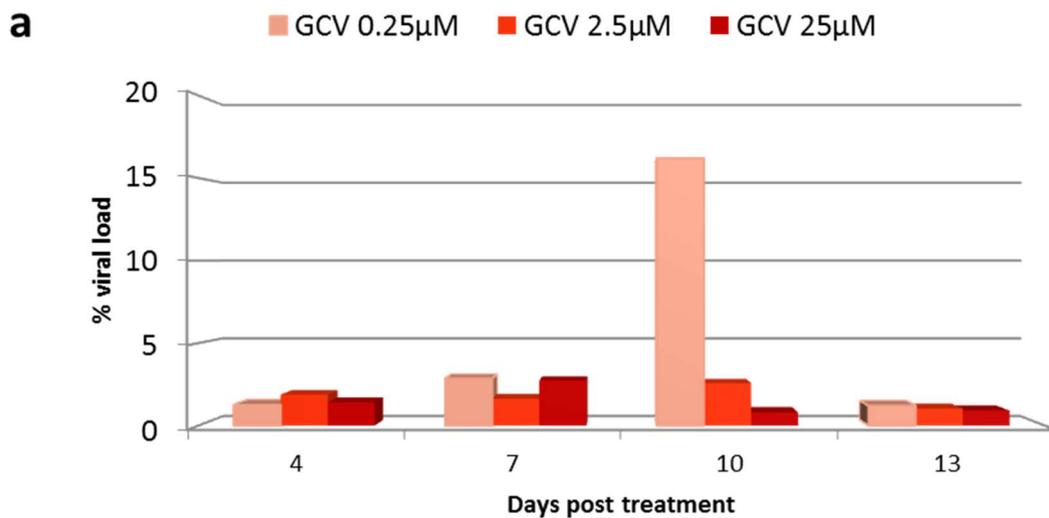
Figure n° 39: Impact des antiviraux sur l'expression des protéines virales IEA et pp65 dans les TEV-1 à J4, J7 et J10. a) impact du ganciclovir (GCV) et de l'artésunate (ART) sur IEA. b) impact du ganciclovir (GCV) et de l'artésunate (ART) sur pp65. c) impact du foscarnet (FOS) et du maribavir (MBV) sur IEA. d) impact du foscarnet (FOS) et du maribavir (MBV) sur pp65

On observe une forte diminution de la protéine IEA avec l'artésunate à 25 et 250 µM (plus de 80% d'inhibition à J4, inhibition supérieure à 60% à J+7 et J+10) Le ganciclovir est moins efficace mais 60% des IEA sont inhibées à J+10 pour les concentrations 2.5 et 25µM. La protéine pp65 est globalement peu inhibée par le

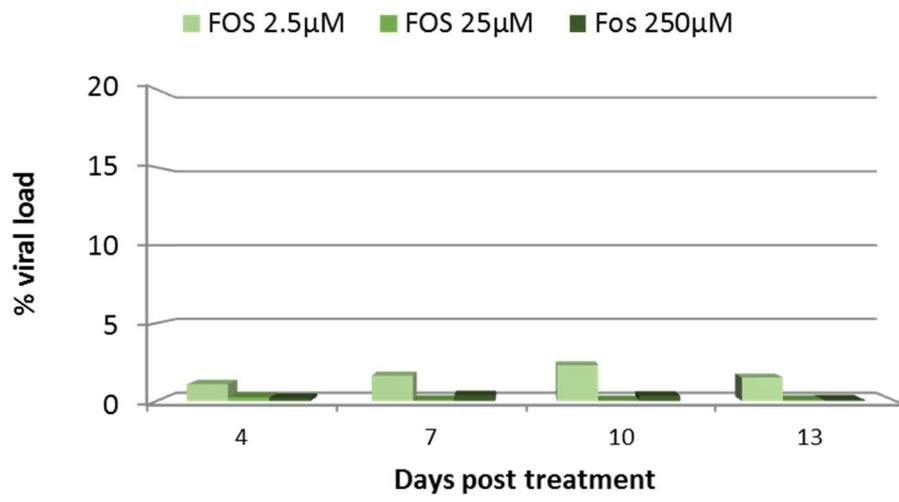
ganciclovir et l'artésunate, mais l'est fortement par le foscarnet à J+7 (plus de 70% d'inhibition) et le maribavir (plus de 70% d'inhibition à J+7, 60 % d'inhibition à J+10)

2.2.3.2 Impact des antiviraux sur l'infection virale dans les placentas

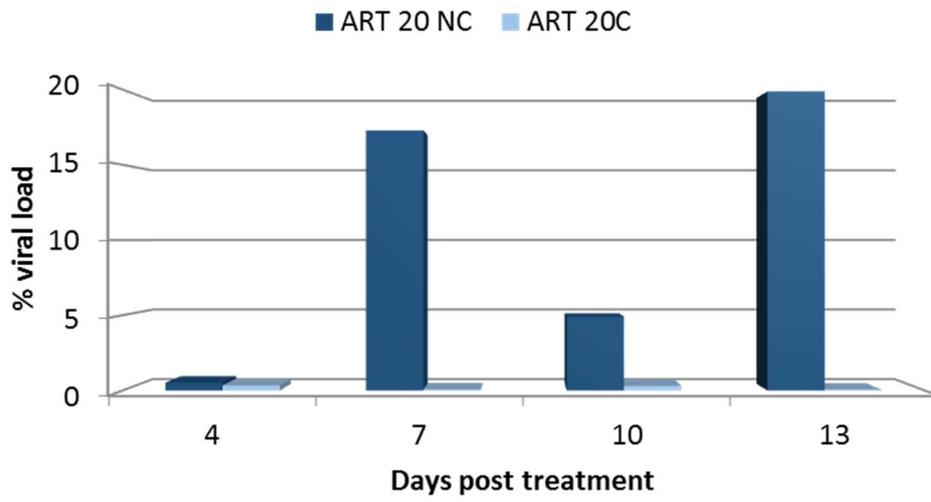
Une fois l'activité antivirale des composés confirmée dans les différentes lignées cellulaires, nous les avons testé *ex-vivo* dans les modèles placentaires de premier et troisième trimestre de grossesse, et déterminé le ratio de charge virale par rapport au contrôle sans antiviral. Nous avons également testé lors du premier trimestre l'impact de l'artésunate en changeant le milieu tous les deux jours ou non. Les graphes de ces résultats sont représentés figures n°40 et n°41.



b



c



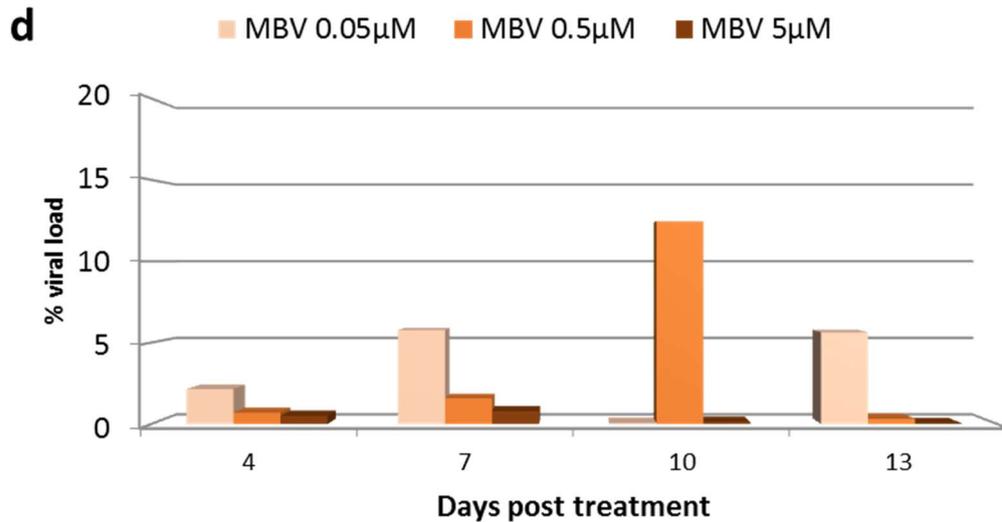
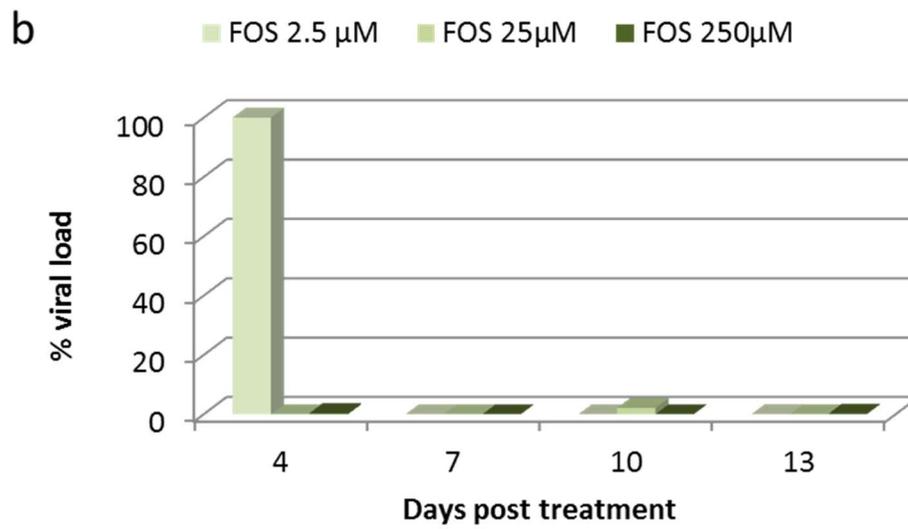
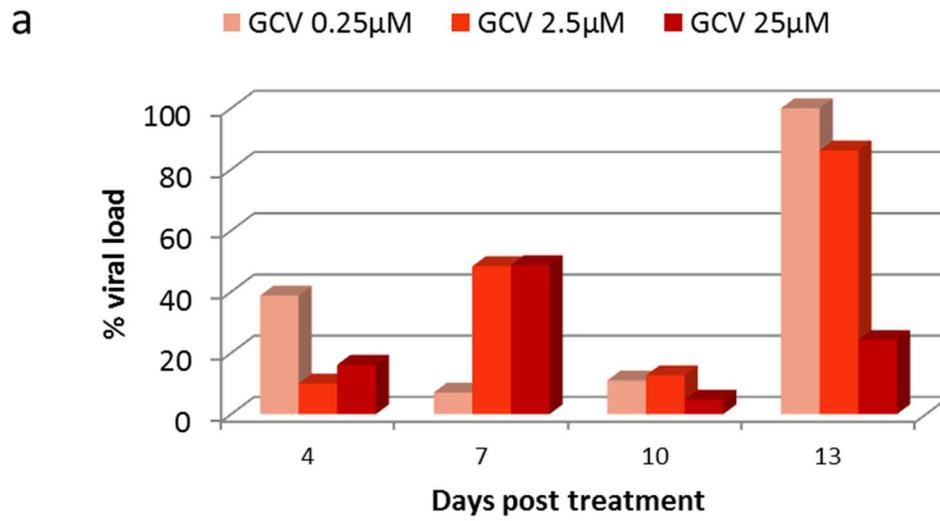


Figure n° 40: Impact des antiviraux dans les explants de premier trimestre à J4, J7, J10 et J13. Les valeurs correspondent au ratio de charge virale exprimé en % d'infection observée par rapport au témoin AD169 (=100% d'infection) a) impact du ganciclovir (GCV). b) impact du foscarnet (FOS). c) impact de l'artésunate changé tous les deux jours (ART C) ou non changé (ART NC), d) impact du maribavir (MBV)

Nous observons une bonne efficacité des antiviraux. L'inhibition de l'ADN viral dans les explants se situe entre 80 et 90% de réduction par rapport au contrôle AD169 sans antiviraux. Les molécules les plus efficaces, réduisant l'infection virale à près de 99%, sont le foscarnet à 25 et 250μM, l'artésunate à 20μM changé tous les deux jours et le maribavir à 5μM.



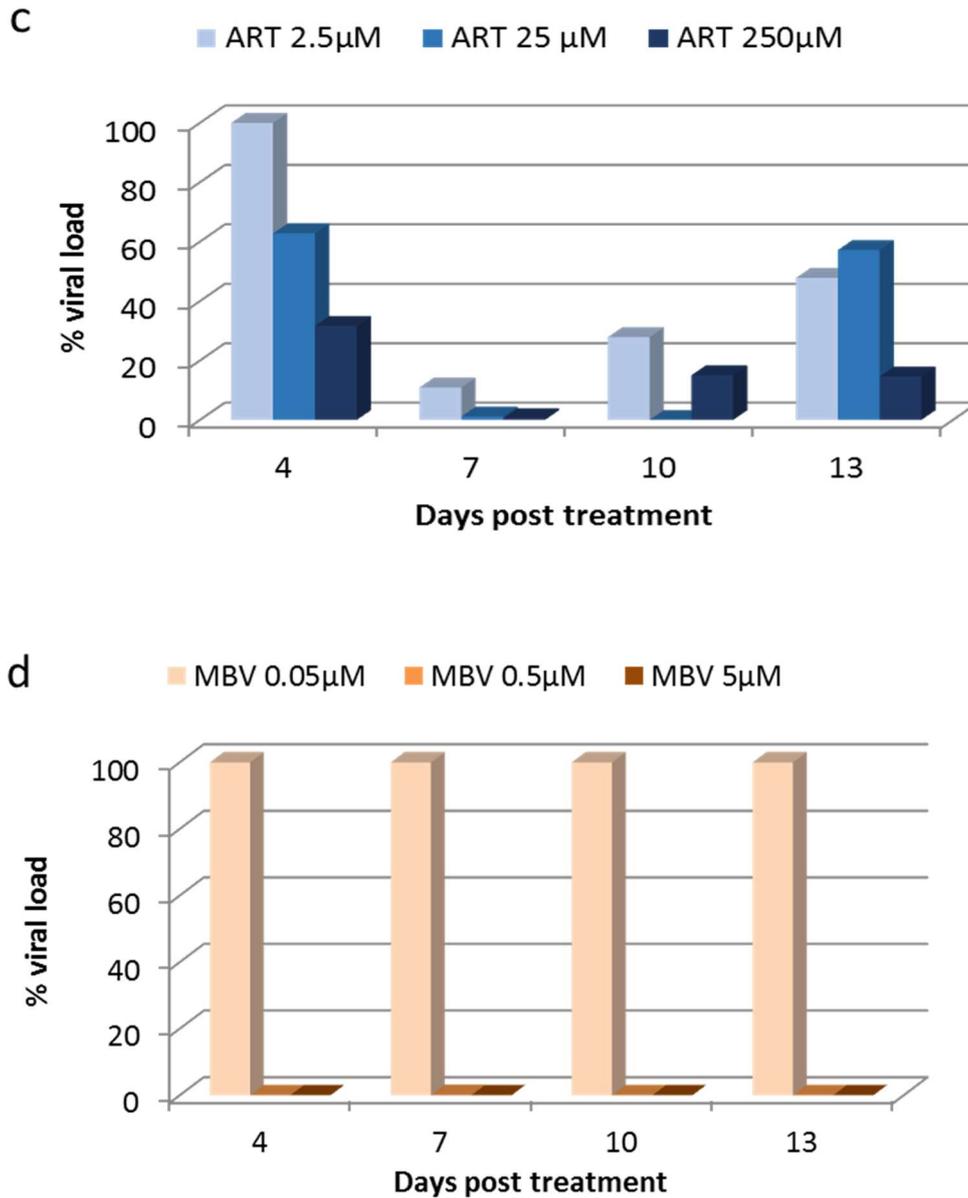


Figure n° 41: Graphiques représentant l'impact des antiviraux dans les explants placentaires de 3ème trimestre à J4, J7, J10 et J13. Les valeurs correspondent au % d'infection observée par rapport au témoin AD169 (=100% d'infection) a) impact du ganciclovir (GCV), b) impact du foscarnet (FOS), c) impact de l'artésunate (ART), d) impact du maribavir (MBV)

Nous avons testé les antiviraux dans les explants de troisième trimestre. Le profil d'infection diffère du premier trimestre. A J+4, aucune réduction de l'infection virale n'est observée pour le foscarnet à une concentration de 2.5 μM, de même pour

l'artésunate à 2.5µM. Le maribavir à une concentration de 0.05µM n'impacte pas l'infection virale par rapport au témoin AD169. Les composés réduisant l'infection virale à plus de 99% au long des 13 jours de l'expérimentation sont le foscarnet 25 et 250µM, le maribavir à 0.5 et 5µM. A J+13, l'infection augmente à nouveau pour l'artésunate à 2.5 et 25µM, ainsi que pour le ganciclovir à 0.25 µM et 2.5 µM.

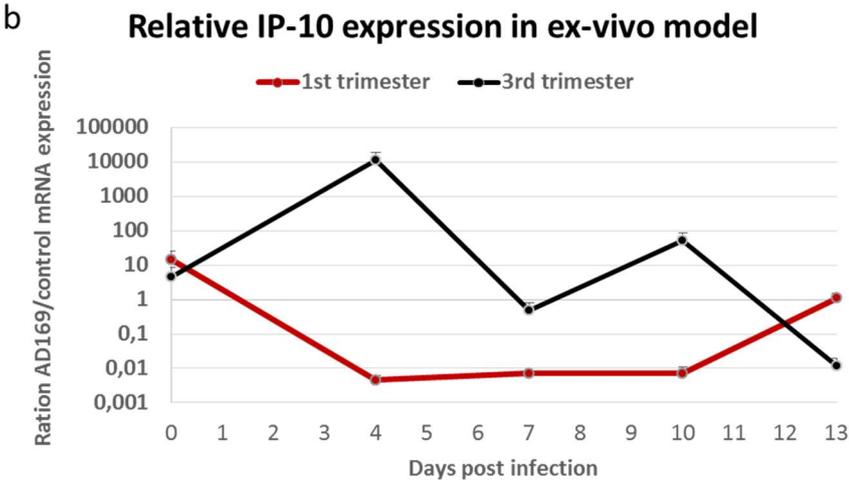
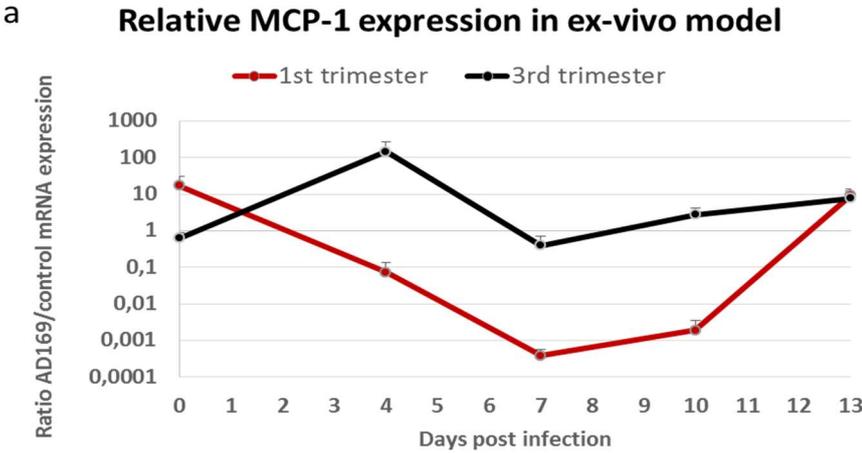
2.2.3.3 Comparaison entre l'expression de cytokines dans les surnageants des explants placentaires de premier et troisième trimestre

Nous pouvons observer que l'infection à CMVH dans le placenta de premier trimestre de grossesse augmente de façon significative les niveaux des chimiokines RANTES (p= 0.005), CXCL10 (p= 0.0006), de l'interféron IFN-γ (p=0.013), des interleukines IL-5 (p=0.008), IL-4 (p=0.02), IL-7 (p=0.01), IL-10 (p=0.03) et G-CSF (p= 0.03). L'excrétion d'éotaxine diminue significativement dans les surnageants des explants infectés par AD169 (p=0.009). Le facteur de croissance PDGF augmente significativement dans les surnageants des explants de troisième trimestre infectés (p= 0.005). MIP1b augmente également de façon significative (p=0.047), les interleukines IL-6, IL-1RA et IL-15 diminuent de façon significative (p= 0.04, p=0.03 et p= 0.05) respectivement.

2.2.3.4 Impact de l'infection à CMVH et des antiviraux dans les explants de premier et de troisième trimestre de grossesse.

Nous avons tout d'abord étudié la différence d'expression des ARNm des cytokines pro-inflammatoires par le ratio entre placenta infecté par la souche AD169 et les placentas non infectés (voir figure n°42). Dans les explants de premier trimestre, l'infection par le virus diminue l'expression des ARNm des cytokines MCP-1 et IP-10 jusqu'à J+10 après infection. Le ratio d'expression de ces cytokines est

significativement plus élevé dans le placenta de troisième trimestre de grossesse (p-value= 0.037 pour MCP-1; p=0.043 pour IP-10). Le profil d'expression de TNF dans les placentas est similaire (p value=0.316).



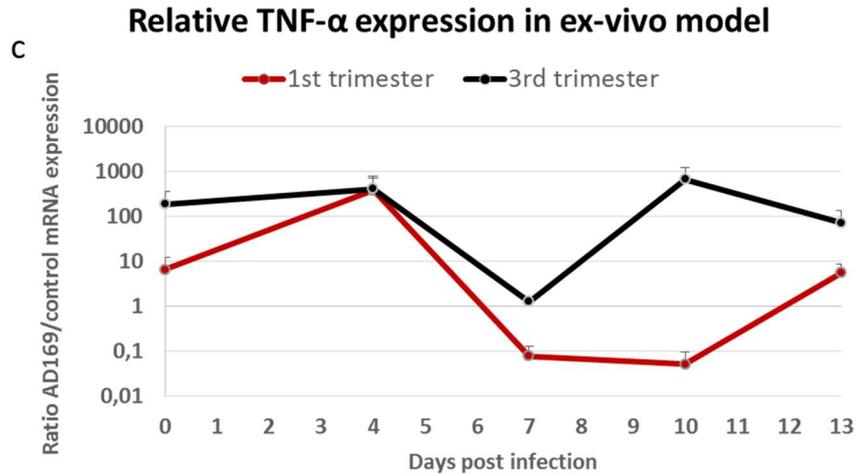
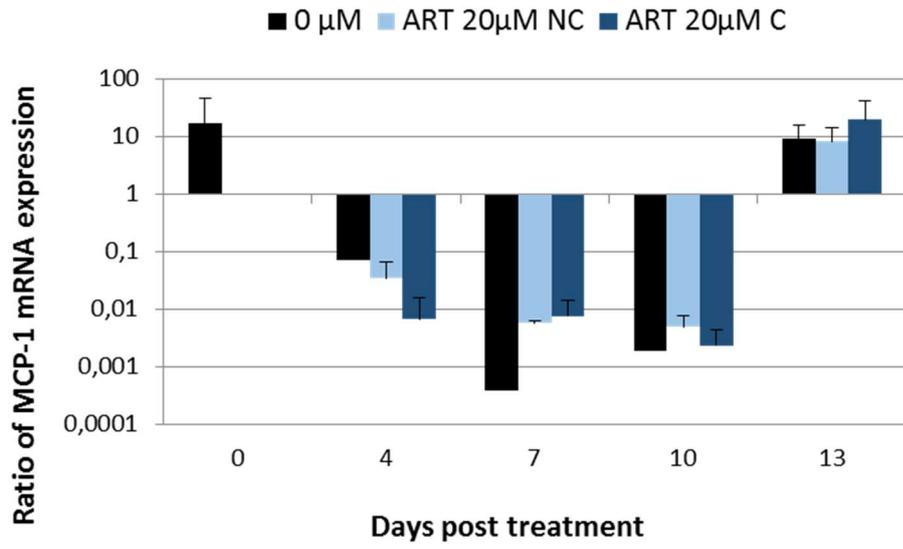
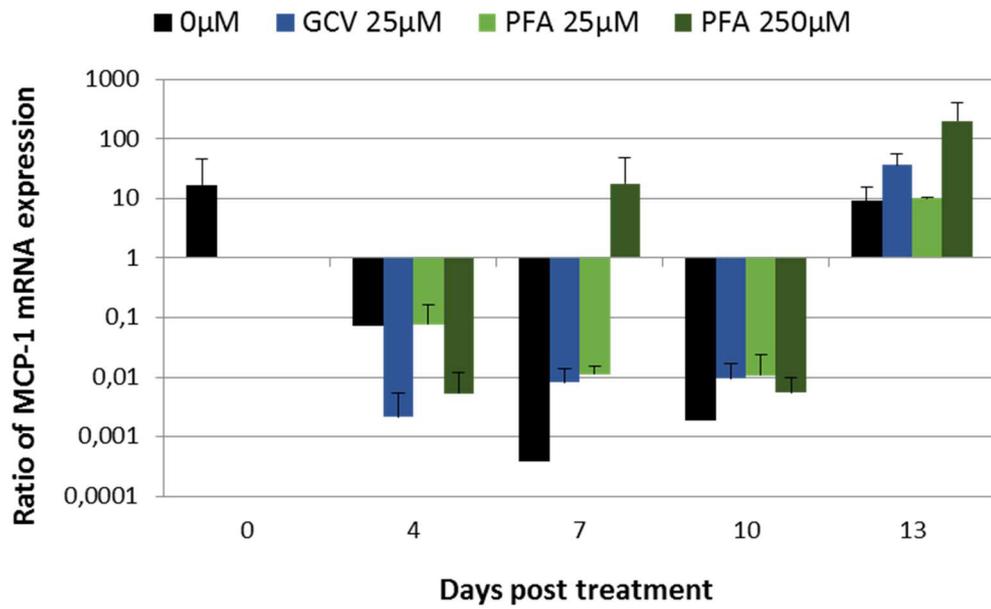


Figure n°42: Profil d'expression des ratios d'ARNm des cytokines pro-inflammatoires dans les explants placentaires de premier et troisième trimestre de grossesse. a) MCP-1; b) IP-10; c) TNF- α

Nous avons ensuite testé différentes concentrations de molécules antivirales anti-CMVH et estimé les ratios d'expression des ARN messagers des cytokines inflammatoires MCP-1, IP-10 et TNF- α avec les placentas non infectés et non traités, afin de déterminer si ces antiviraux ont un impact sur la production de ces cytokines en comparaison avec les placentas infectés. Les résultats sont représentés dans les figures n°43, 44 et 45 pour le premier trimestre.

a**b**

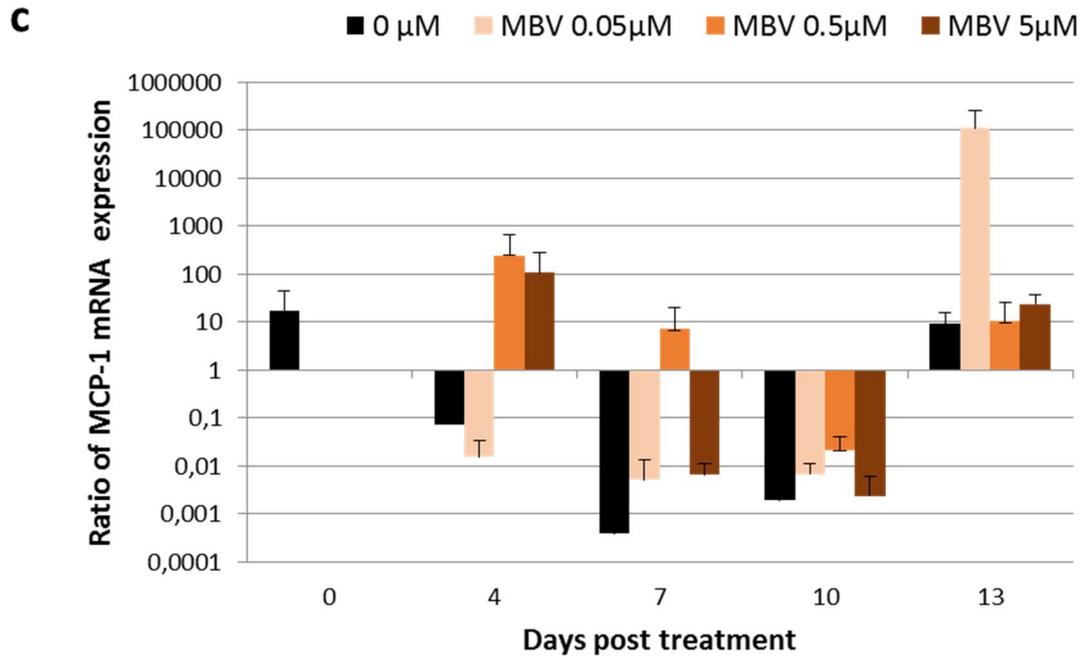


Figure n°43: Impact des antiviraux sur les ratios d'expression des ARNm de MCP-1 à J4, J7, J10 et J13. Les ratios s'expriment en fonction des explants non infectés. a) impact de l'artésunate changé tous les deux jours (ART C) ou non changé (ART NC), b) impact du ganciclovir (GCV) et du foscarnet (FOS), c) impact du maribavir (MBV).

L'artésunate ne semble pas impacter le ratio des ARNm de MCP-1 selon qu'il soit changé tous les deux jours ou non. Le ganciclovir et le foscarnet à 25 μM ont peu d'effet sur ces ARNm, tandis qu'on observe une augmentation du ratio de ces ARNm à J+7 et J+13. Le maribavir à 0.05 μM augmente significativement les ratios de MCP-1 à J+7 et J+13, tandis que cette augmentation s'observe à J+4 pour le maribavir à 0.5 et 5 μM .

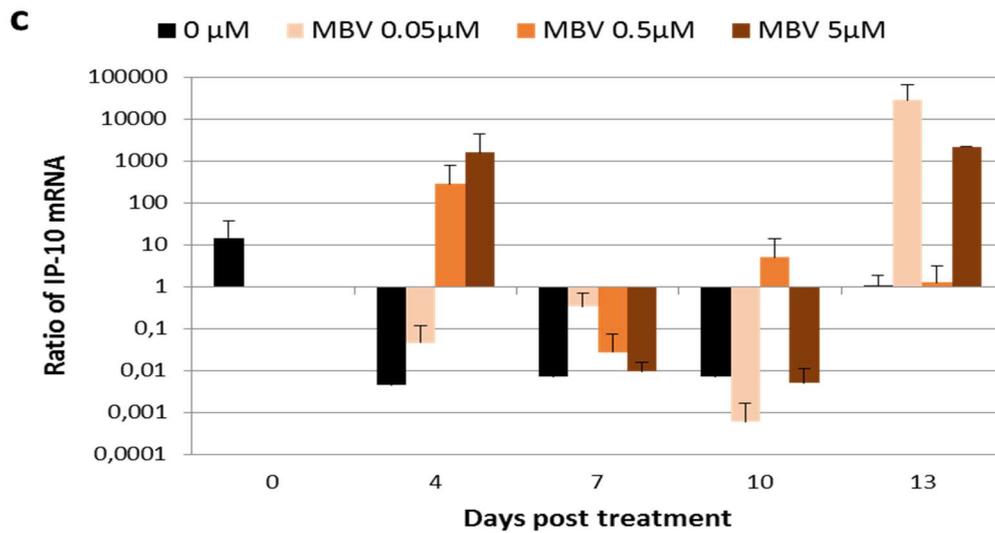
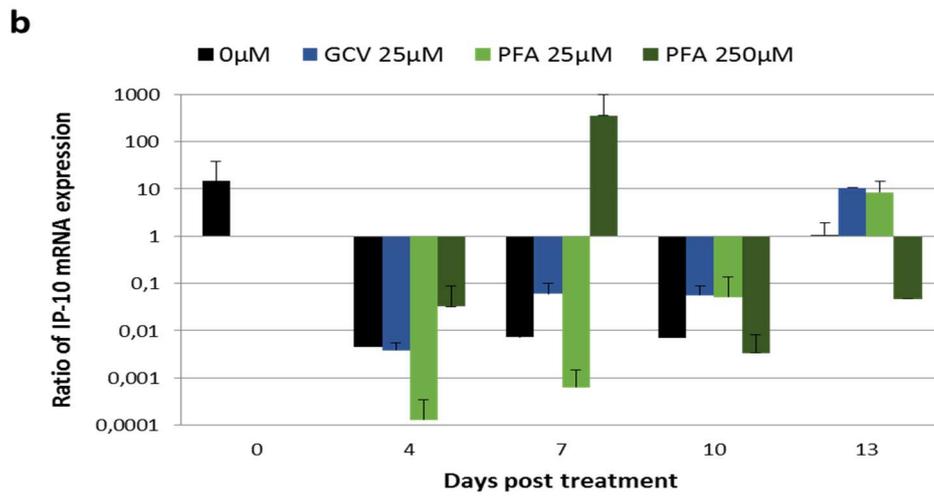
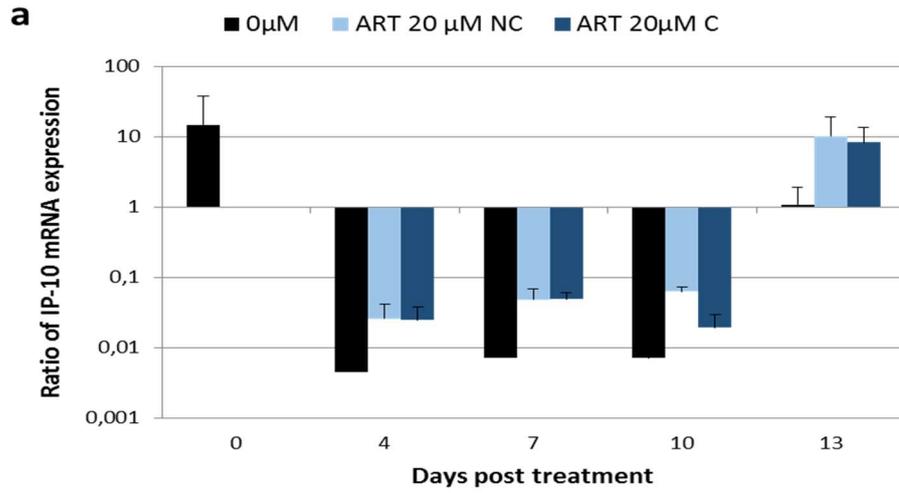
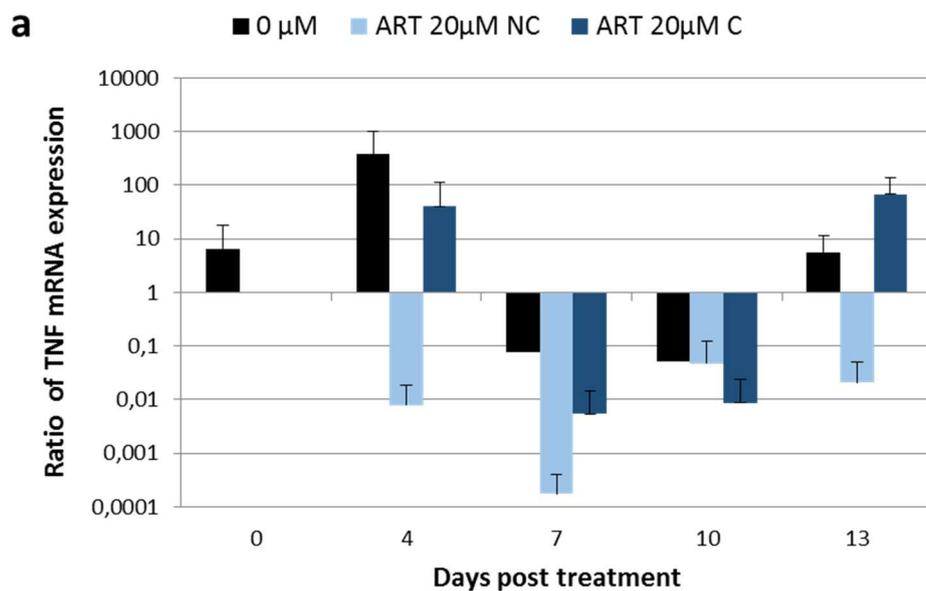


Figure n° 44: Impact des antiviraux sur les ratios d'expression des ARNm d'IP-10 à J4, J7, J10 et J13. Les ratios s'expriment en fonction des explants non infectés. a) impact de l'artésunate changé tous les deux jours (ART C) ou non changé (ART NC), b) impact du ganciclovir (GCV) et du foscarnet (FOS), c) impact du maribavir (MBV).

L'artésunate à 20µM ne semble pas agir sur l'expression de la cytokine inflammatoire IP-10. Ceci s'observe également pour le foscarnet et le ganciclovir à une concentration de 25µM. 250µM de foscarnet augmente significativement la production des ARNm de cette cytokine à J+7, et la diminue fortement à J+13. Le maribavir à 0.05µM augmente fortement la production des ARNm à J+13, tandis qu'une augmentation est observée à J+4 et J+10 lorsque la molécule est augmentée à sa CI50. Enfin, 5µM de maribavir augmente les ARNm dans les tissus placentaires à J+4 et J+13.



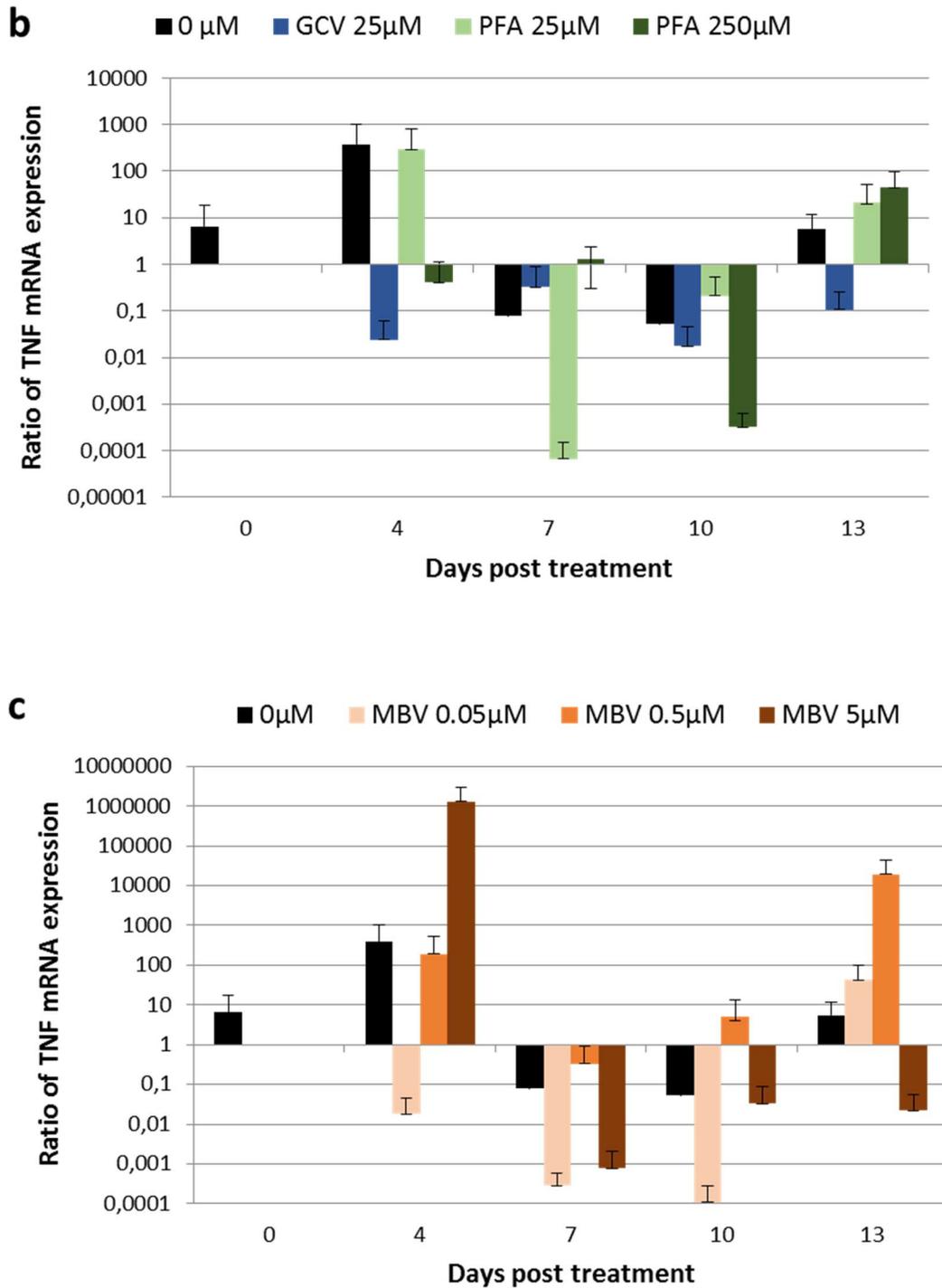
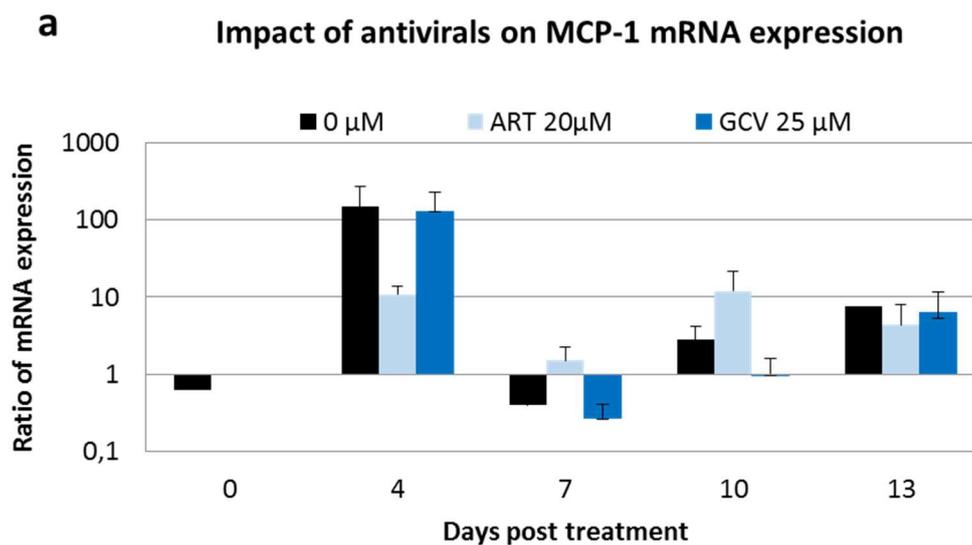


Figure n°45: Impact des antiviraux sur les ratios d'expression des ARNm de TNF- α à J4, J7, J10 et J13. Les ratios s'expriment en fonction des explants non infectés. a) impact de l'artésunate changé tous les deux jours (ART C) ou non changé (ART NC), b) impact du ganciclovir (GCV) et du foscarnet (FOS), c) impact du maribavir (MBV).

L'artésunate à 20 μ M diminue l'expression des ARNm de TNF- α lorsqu'il n'est pas changé tous les deux jours. Le ganciclovir à une concentration de 25 μ M diminue les ratios des ARNm. On observe peu d'impact du foscarnet à 25 μ M, excepté à J+7 où le ratio diminue fortement. 250 μ M de foscarnet diminue fortement le ratio à J+10. Le maribavir concentré à 0.05 μ M diminue l'expression des ARN messagers de J+4 à J+10, tandis qu'on observe une augmentation à J+13 avec le maribavir à une concentration de 0,5 μ M. Enfin, le maribavir à 5 μ M augmente fortement le ratio à J+4 avant de le diminuer à J+7 et J+13.

Nous avons pu tester l'impact de l'artésunate à 20 μ M et du GCV à 25 μ M dans les explants de troisième trimestre. Les ratios d'expression des cytokines par rapport au témoin sans AD169 sont représentés de la figure n°46.



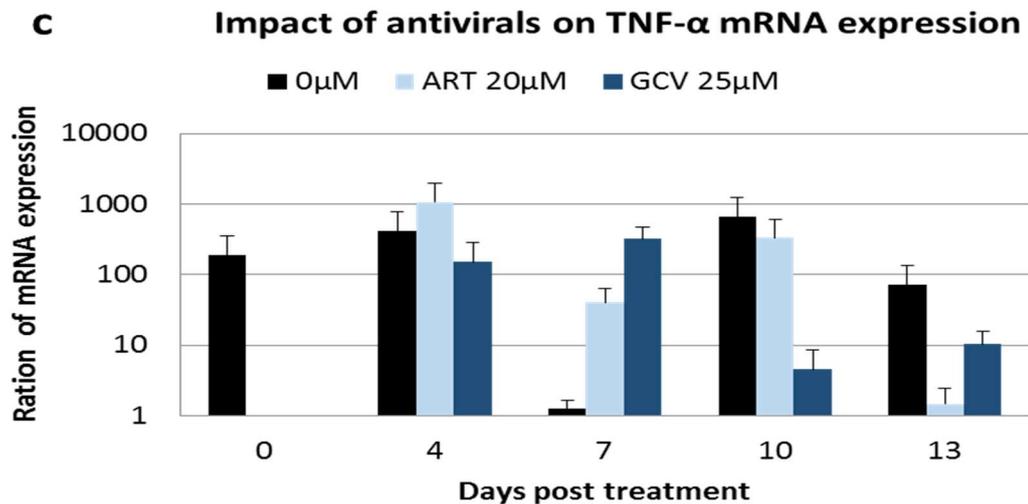
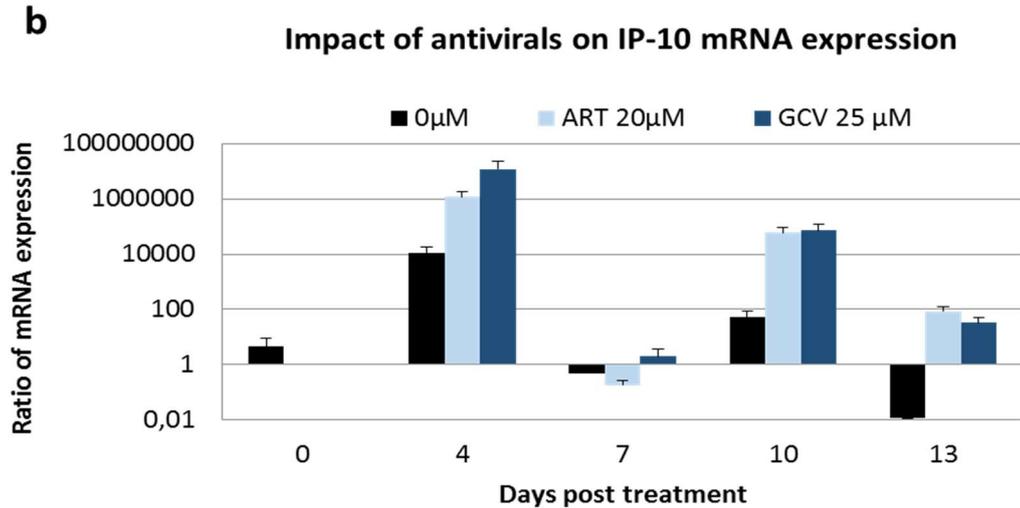


Figure n 46: Impact de l'artésunate (ART) et du ganciclovir (GCV) sur l'expression des ARNm des cytokines pro-inflammatoires à J4, J7, J10, J13. a) Impact sur l'expression des ARNm de MCP-1. b) Impact sur l'expression des ARNm de TNF- α . c) Impact sur l'expression des ARNm de IP-10

L'artésunate n'agit pas sur les ratios d'ARNm de MCP-1, mais augmente les ratios d'IP-10 à J+4, J+10 et J+13, et diminue le ratio de TNF de J+10 à J+13 après une augmentation à J+4 et J+7. Le ganciclovir présente les mêmes effets, excepté pour les ratios de TNF- α qu'il diminue à partir plus fortement à partir de J+10.

2.2.4 Conclusion

Nous avons développé au sein du laboratoire de l'UMR 1092 un modèle d'explants villositaires du 1^{er} trimestre. Ce modèle a été amélioré afin de correspondre plus précisément aux autres modèles décrits dans la littérature (Hamilton et al., 2012). Nous avons ainsi pu comparer l'expression des ARNms des cytokines et l'excrétion de 27 cytokines dans les surnageants de placentas de premier trimestre de grossesse infectés et préparés dans notre unité, et de troisième trimestre infectés et préparés lors du séjour dans l'équipe du Pr Rawlinson.

Nous avons ainsi pu observer que l'infection des villosités par la souche de laboratoire AD169 augmente la production des chimiokines RANTES et CXCL-10 dans les explants de premier trimestre, ainsi que les interleukines G-CSF, IL-7, IL-4, et l'interféron IFN- γ . Dans les explants de troisième trimestre, les niveaux de pDGF et MIP1b augmentent significativement, tandis que les taux d'IL6, IL-1RA et IL-15 diminuent. A noter que l'infection par la souche AD169 diminue également la production de l'éotaxine dans les explants de 1^{er} trimestre.

Ces différentes cytokines sont impliquées dans la stimulation des cellules de l'immunité, telles les granulocytes (G-CSF), les cellules B immatures (IL-7), les cellules T (IL-15), les éosinophiles et cellules B (IL-5). IL-4 est capable d'inhiber l'activité des macrophages, cependant, son activité principale est la modulation immunitaire pour une différenciation en TH2. Nous n'avons pas pu observer de différences significative entre la production dans le surnageant des cytokines pro-inflammatoires TNF- α , MCP-1, contrairement à ce qui a pu être observé dans les tissus par Hamilton et al en 2012. (Hamilton et al., 2012). Nous pouvons supposer

que ces cytokines sont peu excrétées dans le surnageant. Cependant, comme nous n'avons pu travailler sur un seul placenta pour chaque condition, il est difficile de confirmer cette hypothèse, et d'autres essais devront être menés. Il est intéressant de noter que le CMVH induit la production d'autres cytokines lors du second trimestre de grossesse, en effet, il a été démontré par Scott et al que l'infection à CMVH induisait une augmentation dans le liquide amniotique de la quantité des interleukines IL-1 β , IL-12, IL-17, de la chimiokine CCL4 ainsi que des facteurs de croissance GM-CSF et PGFbb (Scott et al., 2012). *A contrario* de ce que nous observons dans les surnageants de culture, les taux de TNF- α et MCP-1 augmentent lors du deuxième trimestre, suggérant que la présence de ces deux cytokines est indispensable à l'infection du placenta par le CMVH. L'augmentation des concentrations en CXCL10 est commune à l'infection des explants de premier trimestre et à l'infection lors du second trimestre. Nous pouvons supposer une excrétion de cette cytokine via la couche de cytotrophoblastes entourant les villosités, cette couche disparaissant au cours du cinquième mois de grossesse.

Nous avons mesuré les ratios des ARN messagers des cytokines pro-inflammatoires MCP-1, IP-10 et TNF- α dans les placentas infectés par la souche AD169. On observe une plus forte expression de MCP-1 et IP-10 dans les explants de 3^{ème} trimestre, alors que la différence est moins significative pour les ARNms de TNF- α . Cependant, nous observons des ratios élevés des ARNms des différentes cytokines dans les explants de troisième trimestre concordant avec l'étude menée par Hamilton en 2012 (Hamilton et al., 2012). De façon intéressante, les ratios des ARNms de MCP-1 et IP-10 diminuent dans les placentas de premier trimestre infectés jusqu'à J+13.

Nous avons ensuite testé différents composés afin de voir leur impact sur la réplication virale et leur effet sur l'expression des transcrits. Nous avons pu voir que ces composés diminuent l'infection virale dans les deux trimestres, avec une efficacité moindre dans les placentas de troisième trimestre. A noter la forte activité de l'artésunate à 250 μ M, probablement due à sa forte toxicité. L'impact des antiviraux sur l'expression des ARNms des cytokines pro-inflammatoires varie également entre le premier trimestre et le troisième trimestre.

L'artésunate étant une molécule peu stable sur le long terme (Schnepf et al., 2011), nous avons comparé les événements induits par cette molécule dans les placentas de premier trimestre en changeant régulièrement ou non le milieu. Nous pouvons constater que si l'efficacité antivirale est meilleure en changeant l'artésunate tous les deux jours, il n'y a pas de différence significative dans l'expression des cytokines selon les deux conditions. L'artésunate semble peu impacter les différentes cytokines, cependant nous observons une légère diminution de TNF- α dans les placentas de deux trimestres.

Les inhibiteurs de la polymérase virale, le ganciclovir et le foscarnet, agissent peu sur l'expression des ARNms des cytokines à une concentration de 25 μ M malgré leur impact sur la réplication virale. Le foscarnet à 250 μ M est cependant associé à une augmentation de MCP-1 et IP-10 dans les explants de premier trimestre et une diminution du ratio de TNF. Le faible impact du foscarnet à une concentration de 25 μ M peut s'expliquer par le fait que la modulation des événements inflammatoires par le CMVH se fait lors des événements précoces de la réplication (Paulus and

Nevels, 2009), tandis que cette molécule agit sur l'ADN polymérase; qui apparaît plus tardivement dans le cycle viral.

Concernant le troisième trimestre, Le ganciclovir semble impacter de façon significative les niveaux d'expression des cytokines TNF- α à J10 et 13 post traitement; l'artésunate, du fait de sa stabilité faible, agit de façon moins efficace. Les résultats concernant le maribavir et le foscarnet seront analysés ultérieurement dans le cadre de notre collaboration.

Conclusion et perspectives

Le CMVH est un problème de santé majeur, et concerne aussi bien les patients transplantés ou immunodéprimés, chez qui le système immunitaire déficient et l'utilisation prolongée de thérapies anti-CMVH favorisent l'émergence de mutations de résistances à ces antiviraux, que les femmes enceintes, chez qui la primo-infection expose à un risque de contamination du fœtus. Devant l'arsenal thérapeutique très limité (peu de molécules, souvent toxiques voire tératogènes), la recherche de nouvelles thérapies est donc indispensable.

Notre travail de thèse a d'abord porté sur l'étude de nouvelles molécules potentiellement antivirales, dérivées des flavonoïdes et possédant un effet inhibiteur de l'enzyme COX-2. Nous avons pu sélectionner *in vitro* l'une d'entre elle, RG193, et l'association synergique avec la baïcaléine ou le maribavir, molécules dont l'efficacité antivirale a été démontrée, est une perspective pour d'éventuelles bithérapies qui permettraient de réduire d'avantage les doses administrées aux patients lors de thérapies. De plus, il serait intéressant de tester ces composés dans des cellules dérivées de la glie, cellules qui, lorsqu'elles sont infectées par le CMVH, tendent à former des pseudos tumeurs.

Nous possédons également un modèle *ex vivo* de culture placentaire. Ce modèle, mimant l'infection aux interfaces materno-fœtales, nous permet de mieux comprendre les mécanismes de l'infection de la mère à l'enfant et également de tester de nouveaux composés antiviraux dans une prospective thérapeutique. En effet, il n'existe actuellement aucune thérapie anti-CMVH pour la femme enceinte, alors que le virus est la première cause d'infection congénitale virale et une cause

majeure de surdité infantile. Ce modèle *ex vivo* nous permet de confirmer des  v nements proches de ceux constatés chez la femme enceinte. La mise en place du modèle nécessitait de confirmer la survie des explants en plaque de culture, ce qui a été démontré par des taux de l'hormone β -HCG constants au long des deux semaines d'expérimentation. La souche de laboratoire AD169 comme les souches cong nitaless peuvent infecter les explants. De premiers essais antiviraux ont été effectués dans le modèle et montrent une efficacité du maribavir, de l'artésunate et de certaines associations de composés.

Cependant, afin de nous rapprocher au plus près des conditions d'infection congénitale, où l'infection par le CMVH se fait par des foyers épars plutôt que par une matrice produisant continuellement du virus (Pereira et al., 2005), nous avons modifié le modèle de culture *ex-vivo* en changeant les explants et les éponges de gélatine au bout de 5 jours d'infection pour les déposer dans une plaque sans fibroblastes comme matrice. Nous avons voulu effectuer un premier travail de comparaison entre les  v nements cytokiniques du premier et du troisième trimestre de grossesse, afin de mieux comprendre l'impact du virus sur la balance Th1/Th2 et les potentiels effets délétères d'un changement de cytokines. Nous avons pu observer une différence d'excrétion des cytokines entre les explants de premier et de troisième trimestre de grossesse.

Nous avons pu tester divers composés connus pour leur efficacité antivirale, dans ce modèle, et avons montré que ceux-ci peuvent réduire l'infection virale de façon significative. Nous avons également analysé l'expression relative des ARN messagers des cytokines pro-inflammatoires MCP-1, IP-10 et TNF- α dans les

explants infectés en présence et en absence d'antiviraux. Nous avons pu observer une plus grande expression de ces ARNms dans les explants de troisième trimestre infectés par la souche AD169 en comparaison avec le premier trimestre. Comme le profil cytokine est orienté Th1 lors du premier trimestre de grossesse, l'expression de ces ARNms est vraisemblablement élevée. Les différents antiviraux utilisés impactent peu l'expression des ARNms. Ceci peut s'expliquer par l'action de ces molécules antivirales, qui ciblent des étapes précoces (foscarnet, ganciclovir) ou tardives (maribavir) de la réplication virale. Or, les protéines du CMVH impliquées dans la modulation des cytokines sont des cytokines très précoces, par exemple, la protéine IE2 agit sur différentes cytokines. (Paulus and Nevels, 2009). L'artésunate agit à des niveaux plus précoces, cependant, sa durée de vie faible peut expliquer son impact limité sur l'expression des cytokines.

Ces résultats représentent une première vision des effets des antiviraux sur le placenta. Cependant, du fait de la difficulté d'obtenir des placentas non infectés par le CMVH, nous avons travaillé sur un faible nombre de placentas (n=4 pour le premier trimestre, n=2 pour le troisième), de nouvelles analyses sur un panel plus large d'échantillons devront être effectuées afin de confirmer nos observations. Des coupes histologiques pourront être effectuées afin de voir si l'utilisation d'antiviraux peut réduire l'impact du virus sans conséquences sur les cellules placentaires. De plus, nous avons travaillé uniquement sur la souche AD169, qui est une souche de laboratoire au tropisme réduit. L'utilisation de la souche Merlin au tropisme plus propice à l'infection des placentas, sera nécessaire afin de se rapprocher au mieux des conditions *in situ*. L'utilisation de souches cliniques issues d'infections congénitales, comme nous l'avons fait précédemment avec P* (Morère et al., 2015),

pourra également être envisagée. Il serait également intéressant de comparer les évènements se déroulant dans notre modèle *ex vivo* de premier trimestre avec des explants infectés par le CMVH *in utero*, d'un point de vue de l'expression des cytokines et de l'impact du virus sur les cellules placentaires, via des coupes et marquages histopathologiques, comme cela a été effectué par Hamilton et al en 2012 (Hamilton et al., 2012).

Bibliographie

Adler, S.P., Starr, S.E., Plotkin, S.A., Hempfling, S.H., Buis, J., Manning, M.L., and Best, A.M. (1995). Immunity induced by primary human cytomegalovirus infection protects against secondary infection among women of childbearing age. *J. Infect. Dis.* *171*, 26–32.

Adler, S.P., Finney, J.W., Manganello, A.M., and Best, A.M. (2004). Prevention of child-to-mother transmission of cytomegalovirus among pregnant women. *J. Pediatr.* *145*, 485–491.

Alain, S., Revest, M., Veyer, D., Essig, M., Rerolles, J.P., Rawlinson, W., Mengelle, C., Huynh, A., Kamar, N., Garrigue, I., et al. (2013). Maribavir use in practice for cytomegalovirus infection in French transplantation centers. *Transplant. Proc.* *45*, 1603–1607.

Al-Khan, A., Caligiuri, A., and Apuzzio, J. (2003). Parvovirus B-19 infection during pregnancy. *Infect. Dis. Obstet. Gynecol.* *11*, 175–179.

Alvarez, J.R., Al-Khan, A., and Apuzzio, J.J. (2005). Malaria in pregnancy. *Infect. Dis. Obstet. Gynecol.* *13*, 229–236.

Avery, R.K., Marty, F.M., Strasfeld, L., Lee, I., Arrieta, A., Chou, S., Tatarowicz, W., and Villano, S. (2010). Oral maribavir for treatment of refractory or resistant cytomegalovirus infections in transplant recipients. *Transpl. Infect. Dis. Off. J. Transplant. Soc.* *12*, 489–496.

Baldwin, S., and Whitley, R.J. (1989). Intrauterine herpes simplex virus infection. *Teratology* *39*, 1–10.

Baryawno, N., Rahbar, A., Wolmer-Solberg, N., Taher, C., Odeberg, J., Darabi, A., Khan, Z., Sveinbjörnsson, B., Fuskevåg, O.-M., Segerström, L., et al. (2011). Detection of human cytomegalovirus in medulloblastomas reveals a potential therapeutic target. *J. Clin. Invest.* *121*, 4043–4055.

Basha, J., Iwasenko, J.M., Robertson, P., Craig, M.E., and Rawlinson, W.D. (2014). Congenital cytomegalovirus infection is associated with high maternal socio-economic status and corresponding low maternal cytomegalovirus seropositivity. *J. Paediatr. Child Health* *50*, 368–372.

Beecher, G.R. (2003). Overview of dietary flavonoids: nomenclature, occurrence and intake. *J. Nutr.* *133*, 3248S – 3254S.

Benard, M., Straat, K., Omarsdottir, S., Leghmari, K., Bertrand, J., Davrinche, C., Duga-Neulat, I., Söderberg-Nauclér, C., Rahbar, A., and Casper, C. (2014). Human cytomegalovirus infection induces leukotriene B4 and 5-lipoxygenase expression in human placenta and umbilical vein endothelial cells. *Placenta* *35*, 345–350.

Bernstein, D.I., Schleiss, M.R., Berencsi, K., Gonczol, E., Dickey, M., Khoury, P., Cadoz, M., Meric, C., Zahradnik, J., Duliege, A.-M., et al. (2002). Effect of previous or simultaneous immunization with canarypox expressing cytomegalovirus (CMV) glycoprotein B (gB) on

response to subunit gB vaccine plus MF59 in healthy CMV-seronegative adults. *J. Infect. Dis.* *185*, 686–690.

Bia, F.J., Griffith, B.P., Tarsio, M., and Hsiung, G.D. (1980). Vaccination for the Prevention of Maternal and Fetal Infection with Guinea Pig Cytomegalovirus. *J. Infect. Dis.* *142*, 732–738.

Bischof, P., and Campana, A. (1996). A model for implantation of the human blastocyst and early placentation. *Hum. Reprod. Update* *2*, 262–270.

Boehme, K.W., Guerrero, M., and Compton, T. (2006). Human Cytomegalovirus Envelope Glycoproteins B and H Are Necessary for TLR2 Activation in Permissive Cells. *J. Immunol.* *177*, 7094–7102.

Bogdanow, B., Weisbach, H., Einem, J. von, Straschewski, S., Voigt, S., Winkler, M., Hagemeyer, C., and Wiebusch, L. (2013). Human cytomegalovirus tegument protein pp150 acts as a cyclin A2–CDK-dependent sensor of the host cell cycle and differentiation state. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 201312235.

Bravo, F.J., Cardin, R.D., and Bernstein, D.I. (2007). A model of human cytomegalovirus infection in severe combined immunodeficient mice. *Antiviral Res.* *76*, 104–110.

Bresnahan, W.A., Boldogh, I., Chi, P., Thompson, E.A., and Albrecht, T. (1997). Inhibition of cellular Cdk2 activity blocks human cytomegalovirus replication. *Virology* *231*, 239–247.

Britt, B. in *Human Herpesviruses: Biology, Therapy, and Immunoprophylaxis* (eds. Arvin, A. et al.) (Cambridge University Press, 2007).

Buerger, I., Reefschlaeger, J., Bender, W., Eckenberg, P., Popp, A., Weber, O., Graeper, S., Klenk, H.D., Ruebsamen-Waigmann, H., and Hallenberger, S. (2001). A novel nonnucleoside inhibitor specifically targets cytomegalovirus DNA maturation via the UL89 and UL56 gene products. *J. Virol.* *75*, 9077–9086.

Bughio, F., Umashankar, M., Wilson, J., and Goodrum, F. (2015). Human cytomegalovirus UL135 and UL136 genes are required for post-entry tropism in endothelial cells. *J. Virol.*

Burton, G.J., and Watson, A.L. (1997). The Structure of the Human Placenta: Implications for Initiating and Defending Against Virus Infections. *Rev. Med. Virol.* *7*, 219–228.

Buxmann, H., Stackelberg, O.M. v, Schlößer, R.L., Enders, G., Gonser, M., Meyer-Wittkopf, M., Hamprecht, K., and Enders, M. (2012). Use of cytomegalovirus hyperimmunoglobulin for prevention of congenital cytomegalovirus disease: a retrospective analysis. *J. Perinat. Med.* *40*, 439–446.

Cannon, M.J., Schmid, D.S., and Hyde, T.B. (2010). Review of cytomegalovirus seroprevalence and demographic characteristics associated with infection. *Rev. Med. Virol.* *20*, 202–213.

Chacko, B., and John, G. t. (2012). Leflunomide for cytomegalovirus: bench to bedside. *Transpl. Infect. Dis.* *14*, 111–120.

- Champier, G., Couvreur, A., Hantz, S., Rametti, A., Mazon, M.-C., Bouaziz, S., Denis, F., and Alain, S. (2008). Putative functional domains of human cytomegalovirus pUL56 involved in dimerization and benzimidazole D-ribonucleoside activity. *Antivir. Ther.* *13*, 643–654.
- Chou, S. (2015). Rapid in Vitro Evolution of Human Cytomegalovirus UL56 Mutations that Confer Letemovir Resistance. *Antimicrob. Agents Chemother.* AAC.01623–15.
- Chou, S., Van Wechel, L.C., and Marousek, G.I. (2006). Effect of Cell Culture Conditions on the Anticytomegalovirus Activity of Maribavir. *Antimicrob. Agents Chemother.* *50*, 2557–2559.
- Chou, S., Marousek, G., Auerochs, S., Stamminger, T., Milbradt, J., and Marschall, M. The unique antiviral activity of artesunate is broadly effective against human cytomegaloviruses including therapy-resistant mutants. *Antiviral Res.* *92*, 364–368.
- Compton, T. (2004). Receptors and immune sensors: the complex entry path of human cytomegalovirus. *Trends Cell Biol.* *14*, 5–8.
- Cordier, A.G., Guitton, S., Vauloup-Fellous, C., Grangeot-Keros, L., Benachi, A., and Picone, O. (2012). Awareness and knowledge of congenital cytomegalovirus infection among health care providers in France. *J. Clin. Virol.* *55*, 158–163.
- Cotin, S., Calliste, C.-A., Mazon, M.-C., Hantz, S., Duroux, J.-L., Rawlinson, W.D., Ploy, M.-C., and Alain, S. (2012). Eight flavonoids and their potential as inhibitors of human cytomegalovirus replication. *Antiviral Res.* *96*, 181–186.
- Crough, T., and Khanna, R. (2009). Immunobiology of human cytomegalovirus: from bench to bedside. *Clin. Microbiol. Rev.* *22*, 76–98, Table of Contents.
- Donnelly, L., and Campling, G. (2014). Functions of the placenta. *Anaesth. Intensive Care Med.* *15*, 136–139.
- Dreyer, C., Sablin, M.-P., Faivre, S., and Raymond, E. (2009). [Topics in mTOR pathway and its inhibitors]. *Bull. Cancer (Paris)* *96*, 87–94.
- Du, M.-R., Wang, S.-C., and Li, D.-J. (2014). The integrative roles of chemokines at the maternal–fetal interface in early pregnancy. *Cell. Mol. Immunol.* *11*, 438–448.
- Enders, G., Daiminger, A., Bäder, U., Exler, S., and Enders, M. (2011). Intrauterine transmission and clinical outcome of 248 pregnancies with primary cytomegalovirus infection in relation to gestational age. *J. Clin. Virol.* *52*, 244–246.
- Evers, D.L., Komazin, G., Shin, D., Hwang, D.D., Townsend, L.B., and Drach, J.C. (2002). Interactions among antiviral drugs acting late in the replication cycle of human cytomegalovirus. *Antiviral Res.* *56*, 61–72.
- Faye, A., Pornprasert, S., Dolcini, G., Ave, P., Taïeb, J., Taupin, J.L., Derrien, M., Huerre, M., Barré-Sinoussi, F., Chaouat, G., et al. (2005). Evaluation of the placental environment with a new in vitro model of histocultures of early and term placentae: determination of cytokine and chemokine expression profiles. *Placenta* *26*, 262–267.

- Fisher, S., Genbacev, O., Maidji, E., and Pereira, L. (2000). Human Cytomegalovirus Infection of Placental Cytotrophoblasts In Vitro and In Utero: Implications for Transmission and Pathogenesis. *J. Virol.* *74*, 6808–6820.
- Freitas, A.C., Mariz, F.C., Silva, M. a. R., and Jesus, A.L.S. (2013). Human Papillomavirus Vertical Transmission: Review of Current Data. *Clin. Infect. Dis.* *56*, 1451–1456.
- Fujikawa, T., Numazaki, K., Asanuma, H., Kudo, R., and Tsutsumi, H. (2003). Frequency of human cytomegalovirus-specific T cells during pregnancy determined by intracellular cytokine staining. *J. Med. Virol.* *71*, 527–531.
- Furman, M.H., Ploegh, H.L., and Tortorella, D. (2002). Membrane-specific, Host-derived Factors Are Required for US2- and US11-mediated Degradation of Major Histocompatibility Complex Class I Molecules. *J. Biol. Chem.* *277*, 3258–3267.
- Gaccioli, F., Lager, S., Powell, T., and Jansson, T. (2013). Placental Transport in Response to Altered Maternal Nutrition. *J. Dev. Orig. Health Dis.* *4*, 101–115.
- Gandhi, M.K., and Khanna, R. (2004). Human cytomegalovirus: clinical aspects, immune regulation, and emerging treatments. *Lancet Infect. Dis.* *4*, 725–738.
- Germi, R., Mariette, C., Alain, S., Lupo, J., Thiebaut, A., Brion, J.P., Epaulard, O., Saint Raymond, C., Malvezzi, P., and Morand, P. (2014). Success and failure of artesunate treatment in five transplant recipients with disease caused by drug-resistant cytomegalovirus. *Antiviral Res.* *101*, 57–61.
- Goldmacher, V.S. (2005). Cell death suppression by cytomegaloviruses. *Apoptosis Int. J. Program. Cell Death* *10*, 251–265.
- Goldner, T., Hewlett, G., Ettischer, N., Ruebsamen-Schaeff, H., Zimmermann, H., and Lischka, P. (2011). The Novel Anticytomegalovirus Compound AIC246 (Letermovir) Inhibits Human Cytomegalovirus Replication through a Specific Antiviral Mechanism That Involves the Viral Terminase. *J. Virol.* *85*, 10884–10893.
- Goldner, T., Hempel, C., Ruebsamen-Schaeff, H., Zimmermann, H., and Lischka, P. (2014). Geno- and phenotypic characterization of human cytomegalovirus mutants selected in vitro after letermovir (AIC246) exposure. *Antimicrob. Agents Chemother.* *58*, 610–613.
- Goldner, T., Zimmermann, H., and Lischka, P. (2015). Phenotypic characterization of two naturally occurring human Cytomegalovirus sequence polymorphisms located in a distinct region of ORF UL56 known to be involved in in vitro resistance to letermovir. *Antiviral Res.* *116*, 48–50.
- Gomez, L.M., Ma, Y., Ho, C., McGrath, C.M., Nelson, D.B., and Parry, S. (2008). Placental infection with human papillomavirus is associated with spontaneous preterm delivery. *Hum. Reprod. Oxf. Engl.* *23*, 709–715.
- Griffiths, P.D., Stanton, A., McCarrell, E., Smith, C., Osman, M., Harber, M., Davenport, A., Jones, G., Wheeler, D.C., O’Beirne, J., et al. (2011). Cytomegalovirus glycoprotein-B vaccine

with MF59 adjuvant in transplant recipients: a phase 2 randomised placebo-controlled trial. *The Lancet* 377, 1256–1263.

Gude, N.M., Roberts, C.T., Kalionis, B., and King, R.G. (2004). Growth and function of the normal human placenta. *Thromb. Res.* 114, 397–407.

Gueye, R. (2013). Conception, synthèse et évaluation biologique de nouveaux dérivés flavonoïdiques inhibiteurs potentiels de la cyclooxygénase-2. Thèse de doctorat: chimie organique. Université de Limoges.

Guibert, G., Warszawski, J., Chenadec, J.L., Blanche, S., Benmebarek, Y., Mandelbrot, L., Tubiana, R., Rouzioux, C., Leruez-Ville, M., and Cohort, F.P. (2009). 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.* 48, 1516–1525.

Hadaczek, P., Ozawa, T., Soroceanu, L., Yoshida, Y., Matlaf, L., Singer, E., Fiallos, E., James, C.D., and Cobbs, C.S. (2013). Cidofovir: a novel antitumor agent for glioblastoma. *Clin. Cancer Res. Off. J. Am. Assoc. Cancer Res.* 19, 6473–6483.

Hamilton, S.T., Scott, G., Naing, Z., Iwasenko, J., Hall, B., Graf, N., Arbuckle, S., Craig, M.E., and Rawlinson, W.D. (2012). Human Cytomegalovirus-Induces Cytokine Changes in the Placenta with Implications for Adverse Pregnancy Outcomes. *PLoS ONE* 7, e52899.

Hartline, C.B., Gustin, K.M., Wan, W.B., Ciesla, S.L., Beadle, J.R., Hostetler, K.Y., and Kern, E.R. (2005). Ether Lipid-Ester Prodrugs of Acyclic Nucleoside Phosphonates: Activity against Adenovirus Replication In Vitro. *J. Infect. Dis.* 191, 396–399.

Harwani, S.C., Lurain, N.S., Zariffard, M.R., and Spear, G.T. (2007). Differential inhibition of human cytomegalovirus (HCMV) by toll-like receptor ligands mediated by interferon-beta in human foreskin fibroblasts and cervical tissue. *Viol. J.* 4, 133.

Hertel, L., and Mocarski, E.S. (2004). Global Analysis of Host Cell Gene Expression Late during Cytomegalovirus Infection Reveals Extensive Dysregulation of Cell Cycle Gene Expression and Induction of Pseudomitosis Independent of US28 Function. *J. Virol.* 78, 11988–12011.

Hostetler, K.Y. (2009). Alkoxyalkyl prodrugs of acyclic nucleoside phosphonates enhance oral antiviral activity and reduce toxicity: Current state of the art. *Antiviral Res.* 82, A84–A98.

Iii, J.P.T. (2012). Human cytomegalovirus tegument proteins (pp65, pp71, pp150, pp28). *Viol. J.* 9, 22.

Jackson, S.E., Mason, G.M., and Wills, M.R. (2011). Human cytomegalovirus immunity and immune evasion. *Virus Res.* 157, 151–160.

Jarvis, M.A., and Nelson, J.A. (2007). Molecular basis of persistence and latency. In *Human Herpesviruses: Biology, Therapy, and Immunoprophylaxis*, A. Arvin, G. Campadelli-Fiume, E. Mocarski, P.S. Moore, B. Roizman, R. Whitley, and K. Yamanishi, eds. (Cambridge: Cambridge University Press),.

- Kaptein, S.J.F., Efferth, T., Leis, M., Rechter, S., Auerchs, S., Kalmer, M., Bruggeman, C.A., Vink, C., Stamminger, T., and Marschall, M. (2006). The anti-malaria drug artesunate inhibits replication of cytomegalovirus in vitro and in vivo. *Antiviral Res.* *69*, 60–69.
- Kaul, D.R., Stoelben, S., Cober, E., Ojo, T., Sandusky, E., Lischka, P., Zimmermann, H., and Rubsamen-Schaeff, H. (2011). First report of successful treatment of multidrug-resistant cytomegalovirus disease with the novel anti-CMV compound AIC246. *Am. J. Transplant. Off. J. Am. Soc. Transplant. Am. Soc. Transpl. Surg.* *11*, 1079–1084.
- Kayem, G., and Batteux, F. (2008). *Immunologie de la grossesse*. *Presse Médicale* *37*, 1612–1619.
- Kern, E.R., Hartline, C.B., Rybak, R.J., Drach, J.C., Townsend, L.B., Biron, K.K., and Bidanset, D.J. (2004). Activities of benzimidazole D- and L-ribonucleosides in animal models of cytomegalovirus infections. *Antimicrob. Agents Chemother.* *48*, 1749–1755.
- Kharfan-Dabaja, M.A., and Nishihori, T. (2015). Vaccine therapy for cytomegalovirus in the setting of allogeneic hematopoietic cell transplantation. *Expert Rev. Vaccines* *14*, 341–350.
- Kieffer, F., and Wallon, M. (2013). Chapter 112 - Congenital toxoplasmosis. In *Handbook of Clinical Neurology*, M.L. and H.B.S. Olivier Dulac, ed. (Elsevier), pp. 1099–1101.
- Koga, K., Aldo, P.B., and Mor, G. (2009). Toll-like receptors and pregnancy: trophoblast as modulators of the immune response. *J. Obstet. Gynaecol. Res.* *35*, 191–202.
- Koi, H., Zhang, J., Makrigiannakis, A., Getsios, S., MacCalman, C.D., Strauss, J.F., and Parry, S. (2002). Syncytiotrophoblast is a barrier to maternal-fetal transmission of herpes simplex virus. *Biol. Reprod.* *67*, 1572–1579.
- Kovács, I.J., Hegedűs, K., Pál, A., and Pusztai, R. (2007). Production of Proinflammatory Cytokines by Syncytiotrophoblasts Infected with Human Cytomegalovirus Isolates. *Placenta* *28*, 620–623.
- Landolfo, S., Gariglio, M., Gribaudo, G., and Lembo, D. (2003). The human cytomegalovirus. *Pharmacol. Ther.* *98*, 269–297.
- Lash, G.E., Robson, S.C., and Bulmer, J.N. (2010). Review: Functional role of uterine natural killer (uNK) cells in human early pregnancy decidua. *Placenta* *31*, S87–S92.
- La Torre, R., Nigro, G., Mazzocco, M., Best, A.M., and Adler, S.P. (2006). Placental Enlargement in Women with Primary Maternal Cytomegalovirus Infection Is Associated with Fetal and Neonatal Disease. *Clin. Infect. Dis.* *43*, 994–1000.
- Le Bouteiller, P., Siewiera, J., Casart, Y., Aguerre-Girr, M., El Costa, H., Berrebi, A., Tabiasco, J., and Jabrane-Ferrat, N. (2011). The human decidual NK-cell response to virus infection: what can we learn from circulating NK lymphocytes? *J. Reprod. Immunol.* *88*, 170–175.
- Lee, J.Y., Lee, M., and Lee, S.K. (2011). Role of endometrial immune cells in implantation. *Clin. Exp. Reprod. Med.* *38*, 119–125.

- Lopez, H., Benard, M., Saint-Aubert, E., Baron, M., Martin, H., Al Saati, T., Plantavid, M., Duga-Neulat, I., Berrebi, A., Cristini, C., et al. (2011). Novel model of placental tissue explants infected by cytomegalovirus reveals different permissiveness in early and term placentae and inhibition of indoleamine 2,3-dioxygenase activity. *Placenta* 32, 522–530.
- Lucas, K.G., Bao, L., Bruggeman, R., Dunham, K., and Specht, C. (2011). The detection of CMV pp65 and IE1 in glioblastoma multiforme. *J. Neurooncol.* 103, 231–238.
- Maidji, E., Percivalle, E., Gerna, G., Fisher, S., and Pereira, L. (2002). Transmission of human cytomegalovirus from infected uterine microvascular endothelial cells to differentiating/invasive placental cytotrophoblasts. *Virology* 304, 53–69.
- Maidji, E., McDonagh, S., Genbacev, O., Tabata, T., and Pereira, L. (2006). Maternal antibodies enhance or prevent cytomegalovirus infection in the placenta by neonatal Fc receptor-mediated transcytosis. *Am. J. Pathol.* 168, 1210–1226.
- Maidji, E., Nigro, G., Tabata, T., McDonagh, S., Nozawa, N., Shiboski, S., Muci, S., Anceschi, M.M., Aziz, N., Adler, S.P., et al. (2010). Antibody treatment promotes compensation for human cytomegalovirus-induced pathogenesis and a hypoxia-like condition in placentas with congenital infection. *Am. J. Pathol.* 177, 1298–1310.
- Maltepe, E., Bakardjiev, A.I., and Fisher, S.J. (2010). The placenta: transcriptional, epigenetic, and physiological integration during development. *J. Clin. Invest.* 120, 1016–1025.
- Manicklal, S., Emery, V.C., Lazzarotto, T., Boppana, S.B., and Gupta, R.K. (2013). The “silent” global burden of congenital cytomegalovirus. *Clin. Microbiol. Rev.* 26, 86–102.
- Marchant, A., Appay, V., van der Sande, M., Dulphy, N., Liesnard, C., Kidd, M., Kaye, S., Ojuola, O., Gillespie, G.M.A., Vargas Cuero, A.L., et al. (2003). Mature CD8⁺ T lymphocyte response to viral infection during fetal life. *J. Clin. Invest.* 111, 1747–1755.
- Marschall, M., Feichtinger, S., and Milbradt, J. (2011). Regulatory roles of protein kinases in cytomegalovirus replication. *Adv. Virus Res.* 80, 69–101.
- Marschall, M., Stamminger, T., Urban, A., Wildum, S., Ruebsamen-Schaeff, H., Zimmermann, H., and Lischka, P. (2012). In vitro evaluation of the activities of the novel anticytomegalovirus compound AIC246 (letermovir) against herpesviruses and other human pathogenic viruses. *Antimicrob. Agents Chemother.* 56, 1135–1137.
- Marty, F.M., and Boeckh, M. (2011). Maribavir and human cytomegalovirus-what happened in the clinical trials and why might the drug have failed? *Curr. Opin. Virol.* 1, 555–562.
- Marty, F.M., Winston, D.J., Rowley, S.D., Vance, E., Papanicolaou, G.A., Mullane, K.M., Brundage, T.M., Robertson, A.T., Godkin, S., Momméja-Marin, H., et al. (2013). CMX001 to Prevent Cytomegalovirus Disease in Hematopoietic-Cell Transplantation. *N. Engl. J. Med.* 369, 1227–1236.
- Maussang, D., Langemeijer, E., Fitzsimons, C.P., Stigter-van Walsum, M., Dijkman, R., Borg, M.K., Slinger, E., Schreiber, A., Michel, D., Tensen, C.P., et al. (2009). The human

cytomegalovirus-encoded chemokine receptor US28 promotes angiogenesis and tumor formation via cyclooxygenase-2. *Cancer Res.* 69, 2861–2869.

McDonagh, S., Maidji, E., Ma, W., Chang, H.-T., Fisher, S., and Pereira, L. (2004). Viral and bacterial pathogens at the maternal-fetal interface. *J. Infect. Dis.* 190, 826–834.

McDonagh, S., Maidji, E., Chang, H.-T., and Pereira, L. (2006). Patterns of human cytomegalovirus infection in term placentas: a preliminary analysis. *J. Clin. Virol. Off. Publ. Pan Am. Soc. Clin. Virol.* 35, 210–215.

McSharry, J.J., McDonough, A., Olson, B., Hallenberger, S., Reefschlaeger, J., Bender, W., and Drusano, G.L. (2001). Susceptibilities of human cytomegalovirus clinical isolates to BAY38-4766, BAY43-9695, and ganciclovir. *Antimicrob. Agents Chemother.* 45, 2925–2927.

McVoy, M.A. (2013). Cytomegalovirus Vaccines. *Clin. Infect. Dis.* 57, S196–S199.

Mesdag, V., Salzet, M., and Vinatier, D. (2014a). Le trophoblaste : chef d'orchestre de la tolérance immunologique maternelle. *J. Gynécologie Obstétrique Biol. Reprod.* 43, 657–670.

Mesdag, V., Salzet, M., and Vinatier, D. (2014b). Le trophoblaste : chef d'orchestre de la tolérance immunologique maternelle.

Miller-Kittrell, M., and Sparer, T.E. (2009). Feeling manipulated: cytomegalovirus immune manipulation. *Viol. J.* 6, 4.

Mocarski, E.S. (2004). Immune escape and exploitation strategies of cytomegaloviruses: impact on and imitation of the major histocompatibility system. *Cell. Microbiol.* 6, 707–717.

Mocarski, E.S., and Courcelle (2001). In *Cytomegaloviruses and Their Replication*, (Philadelphia: Lippincott, Williams and Wilkins), pp. 2629–2673.

Morère, L., Andouard, D., Labrousse, F., Saade, F., Calliste, C.-A., Cotin, S., Aubard, Y., Rawlinson, W.D., Esclaire, F., Hantz, S., et al. (2015). Ex vivo model of congenital cytomegalovirus infection and new combination therapies. *Placenta* 36, 41–47.

Naing, Z.W., Scott, G.M., Shand, A., Hamilton, S.T., van Zuylen, W.J., Basha, J., Hall, B., Craig, M.E., and Rawlinson, W.D. (2015). Congenital cytomegalovirus infection in pregnancy: a review of prevalence, clinical features, diagnosis and prevention. *Aust. N. Z. J. Obstet. Gynaecol.*

Nashan, B., Gaston, R., Emery, V., Säemann, M.D., Mueller, N.J., Couzi, L., Dantal, J., Shihab, F., Mulgaonkar, S., Seun Kim, Y., et al. (2012). Review of Cytomegalovirus Infection Findings With Mammalian Target of Rapamycin Inhibitor-Based Immunosuppressive Therapy in De Novo Renal Transplant Recipients. *Transplant. J.* 93, 1075–1085.

Nigro, G., Adler, S.P., La Torre, R., and Best, A.M. (2005). Passive immunization during pregnancy for congenital cytomegalovirus infection. *N. Engl. J. Med.* 353, 1350–1362.

- Painter, G.R., and Hostetler, K.Y. (2004). Design and development of oral drugs for the prophylaxis and treatment of smallpox infection. *Trends Biotechnol.* 22, 423–427.
- Pass, R.F., Zhang, C., Evans, A., Simpson, T., Andrews, W., Huang, M.-L., Corey, L., Hill, J., Davis, E., Flanigan, C., et al. (2009). Vaccine Prevention of Maternal Cytomegalovirus Infection. *N. Engl. J. Med.* 360, 1191–1199.
- Paulus, C., and Nevels, M. (2009). The Human Cytomegalovirus Major Immediate-Early Proteins as Antagonists of Intrinsic and Innate Antiviral Host Responses. *Viruses* 1, 760–779.
- Pédron, B., Guérin, V., Jacquemard, F., Munier, A., Daffos, F., Thulliez, P., Aujard, Y., Luton, D., and Sterkers, G. (2007). Comparison of CD8⁺ T Cell Responses to Cytomegalovirus between Human Fetuses and Their Transmitter Mothers. *J. Infect. Dis.* 196, 1033–1043.
- Pereira, L., Maidji, E., McDonagh, S., and Tabata, T. (2005). Insights into viral transmission at the uterine-placental interface. *Trends Microbiol.* 13, 164–174.
- Plotkin, S. (2015). The history of vaccination against cytomegalovirus. *Med. Microbiol. Immunol. (Berl.)* 204, 247–254.
- Powers, C., and Früh, K. (2008). Rhesus CMV: an emerging animal model for human CMV. *Med. Microbiol. Immunol. (Berl.)* 197, 109–115.
- Randhawa, P., Farasati, N.A., Shapiro, R., and Hostetler, K.Y. (2006). Ether Lipid Ester Derivatives of Cidofovir Inhibit Polyomavirus BK Replication In Vitro. *Antimicrob. Agents Chemother.* 50, 1564–1566.
- Ranganathan, K., Worley, S., Michaels, M., Arrigain, S., Aurora, P., Ballmann, M., Boyer, D., Conrad, C., Eichler, I., Elidemir, O., et al. (2009). CMVIG decreases the risk of cytomegalovirus infection but not disease after pediatric lung transplantation. *J. Heart Lung Transplant. Off. Publ. Int. Soc. Heart Transplant.* 28, 1050–1056.
- Reefschlaeger, J., Bender, W., Hallenberger, S., Weber, O., Eckenberg, P., Goldmann, S., Haerter, M., Buerger, I., Trappe, J., Herrington, J.A., et al. (2001). Novel non-nucleoside inhibitors of cytomegaloviruses (BAY 38-4766): in vitro and in vivo antiviral activity and mechanism of action. *J. Antimicrob. Chemother.* 48, 757–767.
- Revello, M.G., and Gerna, G. (2004). Pathogenesis and prenatal diagnosis of human cytomegalovirus infection. *J. Clin. Virol. Off. Publ. Pan Am. Soc. Clin. Virol.* 29, 71–83.
- Revello, M.G., Lilleri, D., Zavattoni, M., Furione, M., Genini, E., Comolli, G., and Gerna, G. (2006). Lymphoproliferative Response in Primary Human Cytomegalovirus (HCMV) Infection Is Delayed in HCMV Transmitter Mothers. *J. Infect. Dis.* 193, 269–276.
- Revello, M.G., Tibaldi, C., Masuelli, G., Frisina, V., Sacchi, A., Furione, M., Arossa, A., Spinillo, A., Klersy, C., Ceccarelli, M., et al. (2015). Prevention of Primary Cytomegalovirus Infection in Pregnancy. *EBioMedicine* 2, 1205–1210.

- Robbins, J.R., and Bakardjiev, A.I. (2012). Pathogens and the Placental Fortress. *Curr. Opin. Microbiol.* *15*, 36–43.
- Robbins, J.R., Skrzypczynska, K.M., Zeldovich, V.B., Kapidzic, M., and Bakardjiev, A.I. (2010). Placental Syncytiotrophoblast Constitutes a Major Barrier to Vertical Transmission of *Listeria monocytogenes*. *PLoS Pathog* *6*, e1000732.
- Roth, I., Corry, D.B., Locksley, R.M., Abrams, J.S., Litton, M.J., and Fisher, S.J. (1996). Human placental cytotrophoblasts produce the immunosuppressive cytokine interleukin 10. *J. Exp. Med.* *184*, 539–548.
- Roy, S., He, R., Kapoor, A., Forman, M., Mazzone, J.R., Posner, G.H., and Arav-Boger, R. (2015). Inhibition of Human Cytomegalovirus Replication by Artemisinins: Effects Mediated through Cell Cycle Modulation. *Antimicrob. Agents Chemother.* *59*, 3870–3879.
- Sánchez, P. J., Patterson, J. C. & Ahmed, A. in *Avery's Diseases of the Newborn* 513–537 (Elsevier, 2012).
- Schang, L.M. (2002). Cyclin-dependent kinases as cellular targets for antiviral drugs. *J. Antimicrob. Chemother.* *50*, 779–792.
- Schleiss, M.R. (2013). Cytomegalovirus in the Neonate: Immune Correlates of Infection and Protection. *Clin. Dev. Immunol.* *2013*.
- Schleiss, M.R., and McVoy, M.A. (2010). Guinea Pig Cytomegalovirus (GPCMV): A Model for the Study of the Prevention and Treatment of Maternal-Fetal Transmission. *Future Virol.* *5*, 207–217.
- Schleiss, M.R., and Patterson, J.C. (2012). Chapter 37 - Viral Infections of the Fetus and Newborn and Human Immunodeficiency Virus Infection during Pregnancy*. In *Avery's Diseases of the Newborn (Ninth Edition)*, C.A.G.U. Devaskar, ed. (Philadelphia: W.B. Saunders), pp. 468–512.
- Schnepf, N., Corvo, J., Pors, M.-J.S.-L., and Mazon, M.-C. (2011). Antiviral activity of ganciclovir and artesunate towards human cytomegalovirus in astrocytoma cells. *Antiviral Res.* *89*, 186–188.
- Scott, G.M., Chow, S.S.W., Craig, M.E., Pang, C.N.I., Hall, B., Wilkins, M.R., Jones, C.A., Lloyd, A.R., and Rawlinson, W.D. (2012). Cytomegalovirus infection during pregnancy with maternofetal transmission induces a proinflammatory cytokine bias in placenta and amniotic fluid. *J. Infect. Dis.* *205*, 1305–1310.
- Scrivano, L., Sinzger, C., Nitschko, H., Koszinowski, U.H., and Adler, B. (2011). HCMV Spread and Cell Tropism are Determined by Distinct Virus Populations. *PLoS Pathog.* *7*, e1001256.
- Seliger, B., Ritz, U., and Soldano, F. (2006). Molecular mechanisms of HLA class I antigen abnormalities following viral infection and transformation. *Int. J. Cancer* *118*, 129–138.

- Simmons, D.L., Botting, R.M., and Hla, T. (2004). Cyclooxygenase Isozymes: The Biology of Prostaglandin Synthesis and Inhibition. *Pharmacol. Rev.* 56, 387–437.
- Sinzger, C. (2008). Entry route of HCMV into endothelial cells. *J. Clin. Virol.* 41, 174–179.
- Sinzger, C., Grefte, A., Plachter, B., Gouw, A.S., The, T.H., and Jahn, G. (1995). Fibroblasts, epithelial cells, endothelial cells and smooth muscle cells are major targets of human cytomegalovirus infection in lung and gastrointestinal tissues. *J. Gen. Virol.* 76 (Pt 4), 741–750.
- Snydman, D.R. (2011). Why did maribavir fail in stem-cell transplants? *Lancet Infect. Dis.* 11, 255–257.
- Speir, E., Yu, Z.-X., Ferrans, V.J., Huang, E.-S., and Epstein, S.E. (1998). Aspirin Attenuates Cytomegalovirus Infectivity and Gene Expression Mediated by Cyclooxygenase-2 in Coronary Artery Smooth Muscle Cells. *Circ. Res.* 83, 210–216.
- Strowig, T., Brilot, F., and Münz, C. (2008). Noncytotoxic Functions of NK Cells: Direct Pathogen Restriction and Assistance to Adaptive Immunity. *J. Immunol.* 180, 7785–7791.
- Sudarsanam, T.D., Sahni, R.D., and John, G.T. (2006). Leflunomide: a possible alternative for gangciclovir sensitive and resistant cytomegalovirus infections. *Postgrad. Med. J.* 82, 313–314.
- Syrjanen, S., and Puranen, M. (2000). Human Papillomavirus Infections in Children: the Potential Role of Maternal Transmission. *Crit. Rev. Oral Biol. Med.* 11, 259–274.
- Tabata, T., Petitt, M., Fang-Hoover, J., Rivera, J., Nozawa, N., Shiboski, S., Inoue, N., and Pereira, L. (2012). Cytomegalovirus impairs cytotrophoblast-induced lymphangiogenesis and vascular remodeling in an in vivo human placentation model. *Am. J. Pathol.* 181, 1540–1559.
- Tabata, T., Petitt, M., Zydek, M., Fang-Hoover, J., Larocque, N., Tsuge, M., Gormley, M., Kauvar, L.M., and Pereira, L. (2015). Human cytomegalovirus infection interferes with the maintenance and differentiation of trophoblast progenitor cells of the human placenta. *J. Virol.* JVI.03674–14.
- Tardieu, M., Tejiokem, M., and Nguéfac, S. (2013). Chapter 113 - Virus-induced lesions and the fetal brain: examples of the transmission of HIV-1 and CMV from mother to offspring. In *Handbook of Clinical Neurology*, M.L. and H.B.S. Olivier Dulac, ed. (Elsevier), pp. 1103–1108.
- Townsend, L.B., Devivar, R.V., Turk, S.R., Nassiri, M.R., and Drach, J.C. (1995). Design, synthesis, and antiviral activity of certain 2,5,6-trihalo-1-(beta-D-ribofuranosyl)benzimidazoles. *J. Med. Chem.* 38, 4098–4105.
- Trincado, D.E., and Rawlinson, W.D. (2001). Congenital and perinatal infections with cytomegalovirus. *J. Paediatr. Child Health* 37, 187–192.
- Veith, G.L., and Rice, G.E. (1999). Interferon Gamma Expression during Human Pregnancy and in Association with Labour. *Gynecol. Obstet. Invest.* 48, 163–167.

Verghese, P.S., and Schleiss, M.R. (2013). Letermovir Treatment of Human Cytomegalovirus Infection Antiinfective Agent. *Drugs Future* 38, 291–298.

Vomaske, J., Nelson, J.A., and Streblow, D.N. (2009). Human Cytomegalovirus US28: a functionally selective chemokine binding receptor. *Infect. Disord. Drug Targets* 9, 548–556.

Waldman, W.J., Knight, D.A., Blinder, L., Shen, J., Lurain, N.S., Miller, D.M., Sedmak, D.D., Williams, J.W., and Chong, A.S.-F. (1999). Inhibition of Cytomegalovirus in vitro and in vivo by the Experimental Immunosuppressive Agent Leflunomide. *Intervirology* 42, 412–418.

Weisblum, Y., Panet, A., Zakay-Rones, Z., Haimov-Kochman, R., Goldman-Wohl, D., Ariel, I., Falk, H., Natanson-Yaron, S., Goldberg, M.D., Gilad, R., et al. (2011). Modeling of human cytomegalovirus maternal-fetal transmission in a novel decidual organ culture. *J. Virol.* 85, 13204–13213.

Wildum, S., Zimmermann, H., and Lischka, P. (2015). In vitro drug combination studies of letermovir (AIC246, MK-8228) with approved anti Human Cytomegalovirus (HCMV) and HIV compounds in inhibition of HCMV and HIV replication. *Antimicrob. Agents Chemother.* AAC.00114–00115.

Williams, E.J., Embleton, N.D., Clark, J.E., Bythell, M., Ward Platt, M.P., and Berrington, J.E. (2013). Viral Infections: Contributions to Late Fetal Death, Stillbirth, and Infant Death. *J. Pediatr.* 163, 424–428.

Wolf, D.G., Shimoni, A., Resnick, I.B., Stamminger, T., Neumann, A.U., Chou, S., Efferth, T., Caplan, O., Rose, J., Nagler, A., et al. (2011). Human cytomegalovirus kinetics following institution of artesunate after hematopoietic stem cell transplantation. *Antiviral Res.* 90, 183–186.

You, H., Liu, Y., Agrawal, N., Prasad, C.K., Edwards, J.L., Osborne, A.F., Korourian, S., Lowery, C.L., and Hermonat, P.L. (2008). Multiple human papillomavirus types replicate in 3A trophoblasts. *Placenta* 29, 30–38.

Zhu, H., Cong, J.-P., Yu, D., Bresnahan, W.A., and Shenk, T.E. (2002). Inhibition of cyclooxygenase 2 blocks human cytomegalovirus replication. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 99, 3932–3937.

Zou, R., Drach, J.C., and Townsend, L.B. (1997). Design, synthesis, and antiviral evaluation of 2-chloro-5,6-dihalo-1-beta-D-ribofuranosylbenzimidazoles as potential agents for human cytomegalovirus infections. *J. Med. Chem.* 40, 811–818.

Annexes

1. Milieux pour la culture de cellules/explants placentaires

1.1 Milieu de culture pour MRC-5, HFF, explants

- DMEM qsp 100%
- SVF 10%
- Gentamycine 1%
- Pénicilline 1%
- Streptomycine 1%

1.2 Milieu de culture pour TEV-1

- DMEM F12 qsp 100%
- SVF 10%
- Gentamycine 1%
- Pénicilline 1%
- Streptomycine %

2. Amorces utilisées pour la quantification des ARN messagers

Gène	Amorces	Cycle qPCR
MCP-1	Forward: ATTCCCAAGGGCTCGCTC Reverse: ACTTGCTGCTGCTGGTATTCTTC	95°C-10min ; 95°C 15 s ; 60°C 15s ;72°C 15s (X45) (rampe 5°C/seconde)
IP-10	Forward: TTCAAGGAGTACCTCTCTCTCAG Reverse CTGGATTCAGACATCTCTTCTC	95°C-10min ; 95°C 15 s ; 60°C 15s ;72°C 15s (X45) (rampe 5°C/seconde)
TNF- α	Forward: CCAGGGACCTCTCTCTAATCAG Reverse: CTGAGCTTGAGGGTTTGCTACA	95°C-10min ; 95°C 15 s ; 60°C 15s ;72°C 15s (X50) (rampe 5°C/seconde)
House keeping gene (HKG)	Forward: GGGGAGGGTCCTAGGCTTTA Reverse: TACGTCAACGCCGTTTCTGA	95°C-10min ; 95°C 15 s ; 60°C 15s ;72°C 15s (X45) (rampe 5°C/seconde)

Communications orales et posters

- **New Anti CMV Drugs Alone Or In Combination: Efficacy In Cell Culture And Placental Explants**, European congress of virology, 2013, Lyon, France (communication orale)

- **Study Of Impact Of New Cyclooxygenase II Inhibitors On Human Cytomegalovirus Infection *In Vitro***, 3rd Antivirals Congress, 2014, Amsterdam, Pays Bas et 15th International CMV/Beta Herpes virus Workshop 5th International Congenital CMV Conference, 2015 Brisbane, Australie (poster)

- **Phenotypic characterization of new HCMV pUL54 mutations.** 15th International CMV/Beta Herpes virus Workshop 5th International Congenital CMV Conference, 2015 Brisbane, Australie (poster)

-**New antivirals (COX-2 inhibitors) impact on CMV infection *in vitro*** Prince of Wales Hospital Virology Research Laboratory 10 year Symposium, 2015, Sydney, Australie (communication orale)

Mobilité et formations:

02/02/15 au 01/06/15: collaboration au laboratoire de virologie du New South Wales Hospital de Sydney.

Travaux complémentaires

Publication n°3:

“Contrasting effect of new HCMV pUL54 mutations on antiviral drug susceptibility: benefits and limits of 3D modeling”

**Contrasting effect of new HCMV pUL54 mutations on antiviral drug susceptibility:
benefits and limits of 3D modeling**

1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60
61
62
63
64
65

D. Andouard^{1,2,3}, M-C Mazon⁴, G. Ligat^{1,2,3}, A. Couvreur^{1,2,3}, C. Pouteil-Noble⁵, R. Cahen
R, Y. Yasdanpanah⁶, M. Deering^{1,2,3}, S. Alain^{1,2,3}, S. Hantz^{*1,2,3}

(1) Univ. Limoges, UMR 1092, Limoges, France.

(2) INSERM, UMR 1092, Limoges, France.

(3) CHU Limoges, Laboratoire de Bactériologie-Virologie-Hygiène, National Reference
Center for Cytomegaloviruses (NRC), Limoges, France

(4) CHU Saint Louis, Laboratoire de Bactériologie-Virologie, NRC-associated laboratory,
Paris, France

(5) CHU Lyon, Service de Transplantation rénale, Hôpital Edouard Herriot, Lyon, France

(6) CHU Bichat, Service de Maladies infectieuses et Tropicales, Paris, France

*Corresponding author:

Sébastien Hantz, National Reference Center for Cytomegaloviruses, CBRS, Hospital
Dupuytren, 2 avenue ML King, 87000 Limoges. sebastien.hantz@unilim.fr

1 Human cytomegalovirus (HCMV) remains a cause of severe infections in
2 immunocompromised patients as allograft recipients of solid-organ (Beam and Razonable,
3 2012) or hematopoietic stem-cell transplant (Ariza-Heredia et al., 2014) and patients with
4 AIDS. To prevent and manage HCMV infection in those patients, antiviral treatments are
5 given in prophylaxis and/or treatment. All the currently available antiviral drugs, ganciclovir
6 (GCV) or valganciclovir (vGCV), foscarnet (FOS) and cidofovir (CDV) target the viral DNA
7 polymerase. In some patients, long-duration treatment or prophylaxis induce emergence of
8 drug resistance (Alain et al., 2004) (Hantz et al., 2010). Resistance to GCV results mainly
9 from mutations within the kinase *UL97* gene and less frequently from mutations in the DNA
10 polymerase *UL54* gene. FOS and CDV resistance-associated mutations are located in gene
11 *UL54* and mutations that confer cross-resistance to two or more drugs have been described.
12 (Hakki and Chou, 2011). Two new HCMV DNA polymerase *UL54* mutations, D515Y and
13 V787A, located in $\delta C/ExoIII$ domain and in the VI catalytic domain respectively were
14 detected in clinical strains from patients failing therapy. Those domains are known to be
15 essential to *UL54* function, and mutations located within them have been shown responsible
16 for resistance phenotype. Moreover, several mutations occurring at the same positions show
17 different levels of resistance. We thus aimed to measure the impact on drug resistance of
18 D515Y and V787A mutations through HCMV bacterial artificial chromosome (BAC)
19 mutagenesis, a method to get recombinant viruses to assess phenotypic characterization *in*
20 *vitro*.

21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60
61
62
63
64
65
66
67
68
69
70
71
72
73
74
75
76
77
78
79
80
81
82
83
84
85
86
87
88
89
90
91
92
93
94
95
96
97
98
99
100
101
102
103
104
105
106
107
108
109
110
111
112
113
114
115
116
117
118
119
120
121
122
123
124
125
126
127
128
129
130
131
132
133
134
135
136
137
138
139
140
141
142
143
144
145
146
147
148
149
150
151
152
153
154
155
156
157
158
159
160
161
162
163
164
165
166
167
168
169
170
171
172
173
174
175
176
177
178
179
180
181
182
183
184
185
186
187
188
189
190
191
192
193
194
195
196
197
198
199
200
201
202
203
204
205
206
207
208
209
210
211
212
213
214
215
216
217
218
219
220
221
222
223
224
225
226
227
228
229
230
231
232
233
234
235
236
237
238
239
240
241
242
243
244
245
246
247
248
249
250
251
252
253
254
255
256
257
258
259
260
261
262
263
264
265
266
267
268
269
270
271
272
273
274
275
276
277
278
279
280
281
282
283
284
285
286
287
288
289
290
291
292
293
294
295
296
297
298
299
300
301
302
303
304
305
306
307
308
309
310
311
312
313
314
315
316
317
318
319
320
321
322
323
324
325
326
327
328
329
330
331
332
333
334
335
336
337
338
339
340
341
342
343
344
345
346
347
348
349
350
351
352
353
354
355
356
357
358
359
360
361
362
363
364
365
366
367
368
369
370
371
372
373
374
375
376
377
378
379
380
381
382
383
384
385
386
387
388
389
390
391
392
393
394
395
396
397
398
399
400
401
402
403
404
405
406
407
408
409
410
411
412
413
414
415
416
417
418
419
420
421
422
423
424
425
426
427
428
429
430
431
432
433
434
435
436
437
438
439
440
441
442
443
444
445
446
447
448
449
450
451
452
453
454
455
456
457
458
459
460
461
462
463
464
465
466
467
468
469
470
471
472
473
474
475
476
477
478
479
480
481
482
483
484
485
486
487
488
489
490
491
492
493
494
495
496
497
498
499
500
501
502
503
504
505
506
507
508
509
510
511
512
513
514
515
516
517
518
519
520
521
522
523
524
525
526
527
528
529
530
531
532
533
534
535
536
537
538
539
540
541
542
543
544
545
546
547
548
549
550
551
552
553
554
555
556
557
558
559
560
561
562
563
564
565
566
567
568
569
570
571
572
573
574
575
576
577
578
579
580
581
582
583
584
585
586
587
588
589
590
591
592
593
594
595
596
597
598
599
600
601
602
603
604
605
606
607
608
609
610
611
612
613
614
615
616
617
618
619
620
621
622
623
624
625
626
627
628
629
630
631
632
633
634
635
636
637
638
639
640
641
642
643
644
645
646
647
648
649
650
651
652
653
654
655
656
657
658
659
660
661
662
663
664
665
666
667
668
669
670
671
672
673
674
675
676
677
678
679
680
681
682
683
684
685
686
687
688
689
690
691
692
693
694
695
696
697
698
699
700
701
702
703
704
705
706
707
708
709
710
711
712
713
714
715
716
717
718
719
720
721
722
723
724
725
726
727
728
729
730
731
732
733
734
735
736
737
738
739
740
741
742
743
744
745
746
747
748
749
750
751
752
753
754
755
756
757
758
759
760
761
762
763
764
765
766
767
768
769
770
771
772
773
774
775
776
777
778
779
780
781
782
783
784
785
786
787
788
789
790
791
792
793
794
795
796
797
798
799
800
801
802
803
804
805
806
807
808
809
810
811
812
813
814
815
816
817
818
819
820
821
822
823
824
825
826
827
828
829
830
831
832
833
834
835
836
837
838
839
840
841
842
843
844
845
846
847
848
849
850
851
852
853
854
855
856
857
858
859
860
861
862
863
864
865
866
867
868
869
870
871
872
873
874
875
876
877
878
879
880
881
882
883
884
885
886
887
888
889
890
891
892
893
894
895
896
897
898
899
900
901
902
903
904
905
906
907
908
909
910
911
912
913
914
915
916
917
918
919
920
921
922
923
924
925
926
927
928
929
930
931
932
933
934
935
936
937
938
939
940
941
942
943
944
945
946
947
948
949
950
951
952
953
954
955
956
957
958
959
960
961
962
963
964
965
966
967
968
969
970
971
972
973
974
975
976
977
978
979
980
981
982
983
984
985
986
987
988
989
990
991
992
993
994
995
996
997
998
999
1000

D515Y was detected in a CMV-seronegative kidney recipient with seropositive donor included in a Prospective Multicentric Study of Cytomegalovirus Resistance in Transplant Patients and Bone Marrow Recipients (NCT01008540) (Hantz et al., 2010). After loss of the first graft due to chronic rejection, she received a second kidney in March 2007. In April, she underwent anal HSV reactivation treated with valaciclovir (1g/d) during 7 days (first

1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60
61
62
63
64
65

exposition to antiviral). HCMV primo-infection occurred 30 days after transplantation. After 1 month of GCV followed by 3 weeks of vGCV, the viral load became undetectable on June 11th. However 5 days after stopping vGCV, the viral load rose again and GCV therapy had to be started again on July 13th. GCV dosage was adapted from 300 mg/d to 500 mg/d between July and November. During this period, immunosuppressive regimen was reinforced due to impairment of renal function. In spite of five months of GCV therapy, the viral load rose from 3.6 log copies/mL in July to 6 log copies/mL at the beginning of November. Then GCV was switched to foscarnet (FOS) on November 18th. On December 5th, UL97 mutation A594P inducing resistance to GCV and UL54 mutation D515Y of unknown significance were found. The viral load decreased at 4 log copies/mL 23 days after initiation of FOS and then at 3.8 log copies/mL on December 18th. She died in a context of thrombocytopenia and cerebral hemorrhage on December 22th.

V787A was detected in a HIV patient admitted initially for fever and respiratory tract symptoms. On April 2006, CD4 cell count was 14/mm³, and the HIV viral load was 5.48 log copies/mL despite cART by stavudine, didanosine, and boosted saquinavir. HIV genotypic resistance testing showed multiple mutations inducing resistance to all reverse transcriptase- and protease-inhibitors currently available. Fever and respiratory tract symptoms were thought to be related to cytomegalovirus infection as cytomegalovirus DNA was detected in broncho-alveolar lavage fluid by PCR, and pp65 antigenemia level was 174 marked nuclei /200000 leukocytes. The patient was initiated on GCV (i.e., 5 mg/kg bid for 14 days) followed by vGCV maintenance therapy (450 mg bid). vGCV was stopped on June 2006, after 45 days of treatment, because of the occurrence of a rash. At that time cytomegalovirus antigenemia was undetectable. Cytomegalovirus infection was monitored by testing pp65 antigenemia twice a month. On August 2006, pp65 antigenemia level was 83 nuclei/200000 leukocytes. The patient was initiated on CDV (5 mg/kg IV, once per week followed by once per 2 weeks)

1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60
61
62
63
64
65

for a period of one month. CDV was interrupted for ocular hypotonia after 3 infusions and the patient was re-challenged with VGCV for maintenance therapy, which was soon interrupted because of the occurrence of a new rash. On December 2006, despite primary prophylaxis with atovaquone, the patient underwent a severe pneumonia related to *Pneumocystis jirovicii* treated with cotrimoxazole and steroids (1 mg/kg/day). As pp65 antigenemia level increased to 119 nuclei/200000 leukocytes, he was treated with FOS (90 mg/kg IV bid for 14 days, followed by 90 mg/kg once per day). Cytomegalovirus antigenemia assay became negative. However, in March 2007, while the patient still received FOS maintenance therapy (90 mg/kg IV once a day), antigenemia level was 900 nuclei/200000 leukocytes. A genotypic resistance test identified a V787A substitution in the viral DNA polymerase UL54 combined with common polymorphisms, and no resistance-associated change within the UL97 protein kinase.

To generate the mutant viruses we introduced single UL54 mutations (D515Y and V787A) into an EGFP-expressing HCMV BAC (Borst and Messerle, 2000). This HCMV BAC contains an enhanced green fluorescent protein (EGFP) gene in the unique short region and was derived from parental strain pHB5, a BAC-cloned genome of the CMV laboratory strain AD169 (Borst et al., 1999). We generated the recombinant CMV strains using the “en passant” mutagenesis, a two-step recombination system for BAC mutagenesis in *Escherichia coli* strain (Tischer et al., 2010). To reconstitute virus mutants, recombinant BACs were transfected into MRC-5 cells (Biomérieux, Lyon, France) using the liposomal reagent Transfast™ (Promega, Madison, USA) following manufacturer’s instructions. Presence of mutations in *UL54* gene of each virus was confirmed by sequencing. Focus reduction assay in 48-well plates was used to assess antiviral susceptibilities to GCV, CDV and FOS, as described previously (Ducancelle et al., 2004) and inhibitory concentration 50% (IC₅₀) of the mutants were compared with that of the wild-type BAC-HCMV. To estimate the impact of

1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60
61
62
63
64
65

each mutation on viral fitness we inoculated recombinant strains and AD169-EGFP (wild control) in 48-well MRC-5 culture with a multiplicity of infection (MOI) of 0.01. From day 1 to day 8 post inoculation, number of fluorescent cytopathic foci was counted to establish viral growth curves for each recombinant. The inhibitory concentration 50% (IC₅₀) and sensitivity index 50% (IS 50) of the mutants compared to wild-type control AD169-EGFP are described in Table 1. The UL54 ExoIII domain mutant D515Y has a high-level resistance to GCV and to FOS (6.2 fold and 4.7 fold IC₅₀ increases, respectively). The UL54 VI catalytic domain mutant V787A induced a high resistance level to GCV and FOS (4.7 and 3.2 fold IC₅₀ increases respectively). None of these mutations had impact on CDV susceptibility. Growth curves for both mutated strains were similar to that of wild-type BAC-HCMV (Figure 1) showing that UL54 mutations D515Y and V787A had no impact on HCMV replication capacity.

1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60
61
62
63
64
65

Because referring to the 3'-5' exonuclease domain, mutations in δ C/ExoIII region are known to be implicated essentially in cross-resistance against GCV and CDV (Hakki and Chou, 2011). Importantly, our recombinant GFP virus D515Y had a high-level resistance to GCV and FOS but remained sensitive to CDV. However, other amino acid substitutions at the same locus display various effects on antiviral susceptibility. Mutation D515E recently published by Fischer et al (2015) has a lower impact on resistance to GCV in comparison with D515Y and no impact on susceptibility to FOS and to CDV, whereas D515G has no impact on antiviral resistance (Chou et al., 1999; Chou et al., 2003). Mutations mapped into regions II, III and VI of the catalytic domain are mostly involved in FOS +/- GCV resistance. V787A induces high-level drug resistance against both GCV and FOS, as described previously for mutation V787L (Weinberg et al., 2003, Gilbert et al., 2011).

We showed previously the benefit of mapping new mutations into the whole theoretical structure of pUL54, calculated by homology modeling with the standalone version of MODELLER 9.9 (Eswar et al., 2006) in order to speculate about their putative mechanisms of action. The 3D modeling shows that the amino acid 515 is not localized in a structured part of the protein such as an alpha-helix or a beta-sheet (Figure 2). So it is no surprising that three different amino-acid substitutions could lead to various phenotypic resistance profiles depending essentially of the amino-acid type and its own overall dimensions. If replaced by another acidic amino acid, the wild aspartic acid conserves its function. In contrary, substitutions implying a short glycine or a bulky tyrosine which could drastically damage the local structure and/or the function of the translated protein and explain the various phenotypic profiles. The theoretical structure highlights that V787 is part of the interface between the two helices constituting fingers domain involved in both docking of FOS and GCV for its subsequent incorporation into the elongated DNA strand. A simple change of size from V to

1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60
61
62
63
64
65

A, or V to L, as previously described, may impact distance between the two helices and finally causes a modulation of affinity with the antivirals.

To analyze the impact of new mutations of HCMV UL54 polymerase, we could suggest a two-step strategy (3D modeling followed by recombinant virus phenotypic characterization) allowing sharper short-term counseling for clinicians in HCMV drug-resistance. The 3D homology model allows to localize the mutated amino acid and to determine its proximity with the catalytic site of the protein. And thus, it helps to identify mutation with a high probability of resistance involvement. On the opposite, if the mutation concerns a not well-structured part and is located far from the catalytic pocket, 3D model cannot be confidently used for counseling. However, every mutant has to be tested by recombinant virus phenotypic characterization.

References

D.A., G.L., M.D., A.C, S.A. and S.H were supported by grants from the CNR CMV (InVS), the “Région Limousin”, the INSERM and the University of Limoges.

Alain, S., Hantz, S., Scieux, C., Karras, A., Mazon, M.C., Szelag, J.C., Imbert, B.M., Fillet, A.M., Gouarin, S., Mengelle, C., et al. (2004). Detection of ganciclovir resistance after valacyclovir-prophylaxis in renal transplant recipients with active cytomegalovirus infection. *J. Med. Virol.* 73, 566–573.

Ariza-Heredia, E.J., Neshar, L., and Chemaly, R.F. (2014). Cytomegalovirus diseases after hematopoietic stem cell transplantation: A mini-review. *Cancer Lett.* 342, 1–8.

Beam, E., and Razonable, R.R. (2012). Cytomegalovirus in Solid Organ Transplantation: Epidemiology, Prevention, and Treatment. *Curr. Infect. Dis. Rep.* 14, 633–641.

1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60
61
62
63
64
65

Boivin, G., Goyette, N., Farhan, M., Ives, J., and Elston, R. (2012). Incidence of
cytomegalovirus UL97 and UL54 amino acid substitutions detected after 100 or 200 days
of valganciclovir prophylaxis. *J. Clin. Virol.* *53*, 208–213.

Borst, E., and Messerle, M. (2000). Development of a cytomegalovirus vector for somatic
gene therapy. *Bone Marrow Transplant.* *25*, S80–S82.

Borst, E.-M., Hahn, G., Koszinowski, U.H., and Messerle, M. (1999). Cloning of the human
cytomegalovirus (HCMV) genome as an infectious bacterial artificial chromosome in
Escherichia coli: A new approach for construction of HCMV mutants. *J. Virol.* *73*, 8320–
8329.

Chou, S., Marousek, G., Guentzel, S., Follansbee, S.E., Poscher, M.E., Lalezari, J.P., Miner,
R.C., and Drew, W.L. (1997). Evolution of Mutations Conferring Multidrug Resistance
during Prophylaxis and Therapy for Cytomegalovirus Disease. *J. Infect. Dis.* *176*, 786–789.

Chou, S., Lurain, N.S., Weinberg, A., Cai, G.Y., Sharma, P.L., and Crumpacker, C.S. (1999).
Interstrain variation in the human cytomegalovirus DNA polymerase sequence and its
effect on genotypic diagnosis of antiviral drug resistance. Adult AIDS Clinical Trials
Group CMV Laboratories. *Antimicrob. Agents Chemother.* *43*, 1500–1502.

Chou, S., Lurain, N.S., Thompson, K.D., Miner, R.C., and Drew, W.L. (2003). Viral DNA
Polymerase Mutations Associated with Drug Resistance in Human Cytomegalovirus. *J.*
Infect. Dis. *188*, 32–39.

Chou, S., Marousek, G., Li, S., and Weinberg, A. (2008). Contrasting drug resistance
phenotypes resulting from cytomegalovirus DNA polymerase mutations at the same
exonuclease locus. *J. Clin. Virol.* *43*, 107–109.

Ducancelle, A., Belloc, S., Alain, S., Scieux, C., Malphettes, M., Petit, F., Brouet, J.-C.,
Sansou Le Pors, M.-J., and Mazon, M.-C. (2004). Comparison of sequential

1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60
61
62
63
64
65

cytomegalovirus isolates in a patient with lymphoma and failing antiviral therapy. *J. Clin. Virol.* 29, 241–247.

Eckle, T., Prix, L., Jahn, G., Klingebiel, T., Handgretinger, R., Selle, B., and Hamprecht, K. (2000). Drug-resistant human cytomegalovirus infection in children after allogeneic stem cell transplantation may have different clinical outcomes. *Blood* 96, 3286–3289.

Eswar, N., Webb, B., Marti-Renom, M.A., Madhusudhan, M.S., Eramian, D., Shen, M.-Y., Pieper, U., and Sali, A. (2006). Comparative protein structure modeling using Modeller. *Curr. Protoc. Bioinforma.* Ed. Board Andreas Baxevanis A1 *Chapter 5*, Unit 5.6.

Fischer, L., Laib Sampaio, K., Jahn, G., Hamprecht, K., and Göhring, K. (2015). Identification of newly detected, drug-related HCMV UL97- and UL54-mutations using a modified plaque reduction assay. *J Clin Virol*

Gilbert, C., Azzi, A., Goyette, N., Lin, S.-X., and Boivin, G. (2011). Recombinant Phenotyping of Cytomegalovirus UL54 Mutations That Emerged during Cell Passages in the Presence of either Ganciclovir or Foscarnet[®]. *Antimicrob. Agents Chemother.* 55, 4019–4027.

Hakki, M., and Chou, S. (2011). The biology of cytomegalovirus drug resistance. *Curr. Opin. Infect. Dis.* 24, 605–611.

Hantz, S., Garnier-Geoffroy, F., Mazon, M.-C., Garrigue, I., Merville, P., Mengelle, C., Rostaing, L., Marcoux, F.S., Essig, M., Rerolle, J.-P., et al. (2010). Drug-resistant cytomegalovirus in transplant recipients: a French cohort study. *J. Antimicrob. Chemother.* 65, 2628–2640.

S. Liu, J.D. Knafels, J.S. Chang, G.A. Waszak, E.T. Baldwin, M.R. Deibel Jr., D.R. Thomsen, F.L. Homa, P.A. Wells, M.C. Tory, R.A. Poorman, H. Gao, X. Qiu, A.P. Seddon. (2006) Crystal structure of the herpes simplex virus 1 DNA polymerase. *J. Biol. Chem.*, 281, pp. 18193–18200

1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60
61
62
63
64
65

Tischer, B.K., Smith, G.A., and Osterrieder, N. (2010). En passant mutagenesis: a two step markerless red recombination system. *Methods Mol. Biol. Clifton NJ* 634, 421–430.

Weinberg, A., Jabs, D.A., Chou, S., Martin, B.K., Lurain, N.S., Forman, M.S., Crumpacker, C., Cytomegalovirus Retinitis and Viral Resistance Study Group, and Adult AIDS Clinical Trials Group Cytomegalovirus Laboratories (2003). Mutations conferring foscarnet resistance in a cohort of patients with acquired immunodeficiency syndrome and cytomegalovirus retinitis. *J. Infect. Dis.* 187, 777–784.

Table(s)[Click here to download Table\(s\): Table 1.docx](#)

Virus Mutation	GCV		CDV		FOS	
	IC50 (μ M)	Ratio ^b	IC50 (μ M)	Ratio ^b	IC50 (μ M)	Ratio ^b
AD169 BAC	2^a		0.32		40.8^a	
D515Y BAC	15.5 \pm 5.3	6.2	0.22 \pm 0.1	0.87	146.3 \pm 23,9	4.7
V787A BAC	9.8 \pm 1.4	4.7	0.22 \pm 0.1	0.68	205 \pm 7.5	3.2

Table 1: Derivative AD69 BAC-GFP antiviral susceptibilities (D515Y and V787A mutations). Concentrations inhibiting 50% of viral growth (IC₅₀) were obtained from three independent experiments. ^a AD169 IC50 values are mean of all assays, ^b Fold increase in IC50 mean values compared to the average IC50 for the wild type control.

Figure(s)

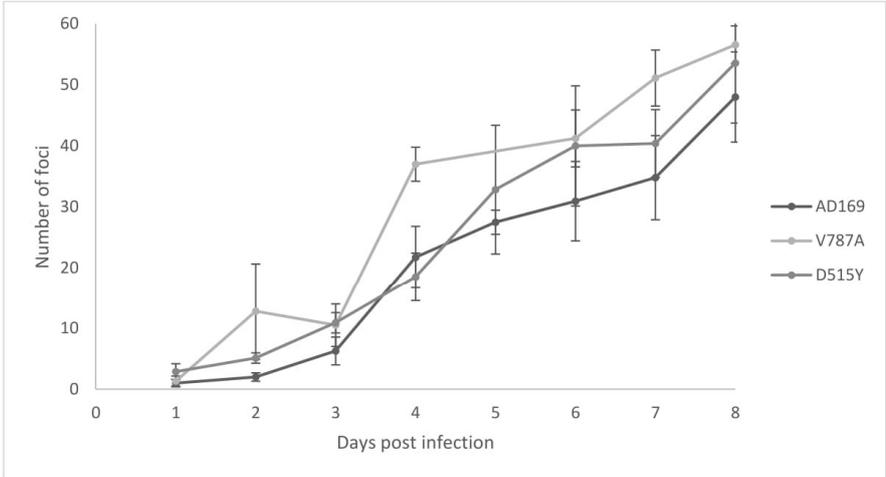


Fig 1: Replication of derivative HCMV BAC (D515Y and V787A mutation) in cell-culture within time to evaluate replicative capacity. Fluorescent foci were counted daily from day 1 to day 8. Curves are representative of three independent experiments.

Figure(s)

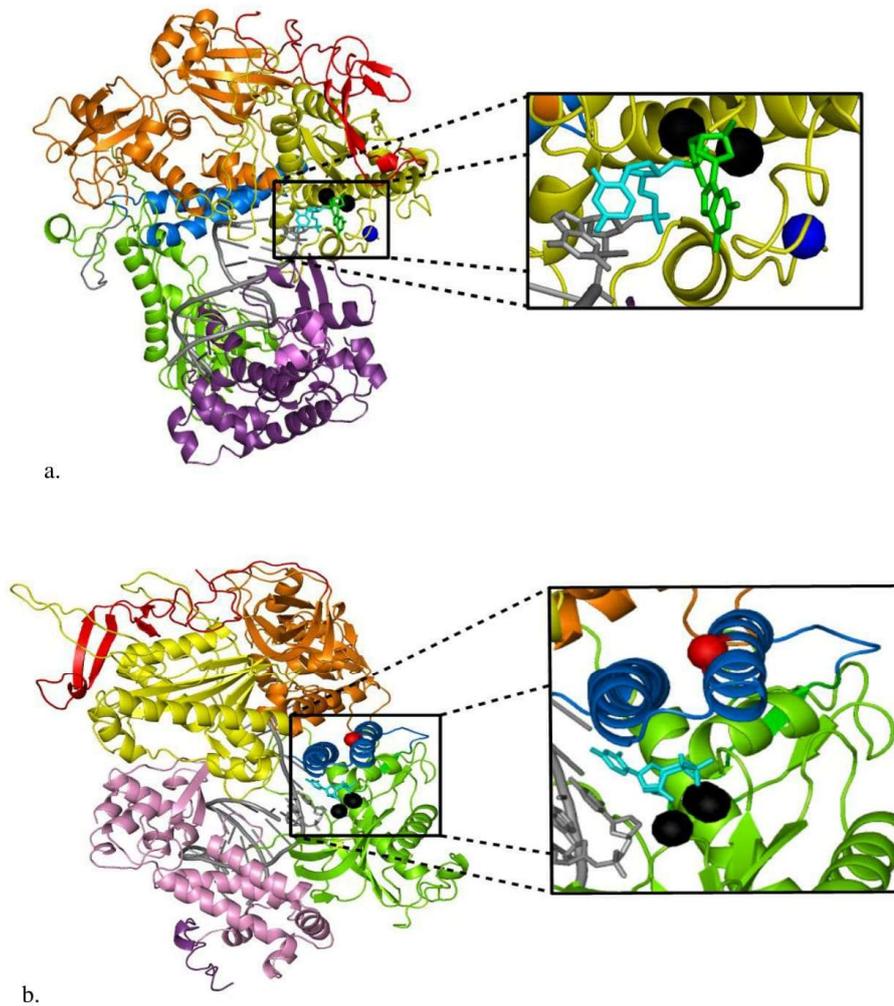


Fig. 2: Overall theoretical structures of pUL54 calculated with MODELLER© are represented in cartoon mode, with two different orientations. Mutations locations are highlighted in insets. For both structures, the different domains according to homology with pUL52 from HSV1 (Liu and al., 2006) are colored as follow: residues 27-98 of pre-NH₂-terminal in red, residues 99-295 and 555-600 of NH₂-terminal in orange, residues 296-554 of 3' -5' exonuclease in yellow, residues 678-765, 815-877 and 887-982 of palm in green, residues 766-824 of fingers in blue, residues 982-1112 and 1154-1222 of thumb in pink and residues 1223-1242 of the interaction domain with pUL44 in purple. In insets, the DNA duplex is colored in gray excepted nucleotide *i* + 1 (green) and *i*-1 (blue) from scissile phosphate bound. Metal ions are colored in black, for better clarity, moiety G307-P312 was removed.

a. D515Y mutation location; carbon alpha atoms of amino acid 515 is represented in navy blue sphere. b. V787A mutation location; carbon alpha atoms of amino acid 787 is represented in red sphere.

Résumé :

Le cytomégalo­virus humain (CMVH) est un virus mondiale­ment répandu impliqué dans des pathologies sévères chez les sujets immunodéficients et lors d'infection congénitale. L'arsenal thérapeutique est limité, non dénué de toxicité, et ne pouvant être administrés aux femmes enceintes. De plus, ces traitements favorisent l'émergence de mutations de résistance. Il est donc nécessaire de développer de nouvelles thérapies, mais également de mieux comprendre les mécanismes de l'infection à CMVH lors de la grossesse. Au cours de ce travail de thèse, nous avons travaillé sur différents modèles d'infection virale, premièrement *in vitro* afin de tester de nouvelles molécules au potentiel antiviral, ciblant l'enzyme cyclooxygénase-2 impliquée dans les processus d'inflammation; secondairement, *ex vivo*, sur des explants de placentas de premier et troisième trimestre. Dans ce dernier modèle, nous nous sommes intéressés au profil d'expression des cytokines inflammatoires induites par l'infection à CMVH.

Nous avons ainsi testé des nouveaux inhibiteurs de la cyclooxygénase-2 *in vitro*. L'un d'entre eux, RG193, montre un effet synergique avec le maribavir et la baïcaléine, ce qui est prometteur pour d'éventuelles bithérapies. Concernant le modèle de culture *ex vivo*, nous avons pu démontrer la viabilité des explants et l'efficacité antivirale de diverses molécules sur l'infection à CMVH. Les résultats préliminaires sur l'expression des cytokines par les placentas infectés montrent des différences notables entre premier et troisième trimestre de grossesse. Cependant, les antiviraux testés semblent avoir peu d'impact sur la régulation des ARN messagers des cytokines pro-inflammatoires MCP-1, TNF- α , IP-10 suite à l'infection.

Mots clés : Cytomégalo­virus, molécules antivirales, cytokines, placenta

Impact of antiviral molecules against human cytomegalovirus replication in cellular and placental models.

The human cytomegalovirus (HCMV) is a worldwide common virus involved in diseases in immunocompromised patients, and in congenital infection. Antiviral drugs are limited, not devoid of toxicity, and so cannot be administered to pregnant women. Moreover, they promote the emergence of resistance mutations. Development of new therapies is necessary, also a better understanding of the mechanisms of HCMV infection during pregnancy. In this work, we used different models of viral infection; firstly *in vitro*, in order to test new potential antiviral molecules targeting the cyclooxygenase 2 enzyme, which is involved in the inflammation process; secondly an *ex vivo* model, on first and third trimester placental explants. We also studied the expression profile of inflammatory cytokines induced by the HCMV infection in this model.

We have tested new cyclooxygenase 2 inhibitors *in vitro*. Within them, RG193 shows a synergistic effect with the maribavir and baicalein, which is promising for potential dual therapy. Concerning the *ex vivo* culture model, we could demonstrate the viability of explants and antiviral efficacy of various molecules on HCMV infection. Preliminary results on the expression of cytokines in infected placentas show differences between first and third trimester of pregnancy. However, antiviral tested appear to have little impact on the regulation of proinflammatory cytokines MCP-1, TNF- α , IP-10 mRNA during infection.

Keywords: Cytomegalovirus, antiviral compounds, cytokines, placenta