



En vue de l'obtention du DOCTORAT DE L'UNIVERSITÉ DE TOULOUSE

Délivré par l'Université Toulouse 3 - Paul Sabatier

Présentée et soutenue par Mathilde BERGAMELLI

Le 9 décembre 2021

Impact de l'infection congénitale par le Cytomégalovirus humain sur la sécrétion de petites vésicules extracellulaires placentaires et conséquences sur le développement cérébral foetal

Ecole doctorale : BSB - Biologie, Santé, Biotechnologies

Spécialité : PHYSIOPATHOLOGIE

Unité de recherche : INFINITY - Institut Toulousain des Maladies Infectieuses et Inflammatoires

> Thèse dirigée par Cécile MALNOU

> > Jury

Mme Dr. Sophie ROME, Rapporteure Mme Pr. Audrey ESCLATINE, Rapporteure M. Dr. Thierry FOURNIER, Examinateur M. Pr. Jacques IZOPET, Examinateur M. Dr. Yann SELLIER, Examinateur Mme Dr. Cécile MALNOU, Directrice de thèse

Remerciements

Je souhaite remercier en premier lieu l'ensemble des membres du jury qui m'ont fait l'honneur d'évaluer mon travail de thèse. Je remercie le Pr. Audrey Esclatine pour sa lecture attentive de mon manuscrit ainsi que pour ses retours critiques et pertinents. Merci également au Dr. Sophie Rome d'avoir pris le temps de partager avec moi d'une part des pistes de recherche et d'autre part sa vision sur les objectifs réels d'une soutenance de thèse. Merci au Dr. Thierry Fournier, le « père » des Hipec, sans qui une grande partie de ce travail n'aurait pas vu le jour. Un merci chaleureux au Dr. Yann Sellier, qui m'a permis de rencontrer le monde de la recherche et celui du Cytomégalovirus. Et enfin merci au Pr. Jacques Izopet d'avoir accepté de présider ce jury, la double casquette clinicien-chercheur y est donc bien représentée. Et merci par avance à vous tous pour cette soutenance !

Un merci particulier à Cécile Malnou. Le combo de choc « doctorante-directrice de thèse » que nous formons touche à sa fin. Je te remercie pour ces 3 années de sciences, de support et d'apprentissage intenses. Merci d'avoir pris du temps pour répondre avec pédagogie et justesse à mes nombreuses interrogations, scientifiques ou non. Je suis ravie d'avoir passé cette thèse sous ta direction, merci.

Un grand merci à Hélène Martin. Nous avons beaucoup – et très bien - travaillé toutes les deux, je suis très contente d'avoir partagé avec toi ces moments, plus ou moins studieux... Je trouve que nos papiers à quatre mains sont très beaux. Merci de m'avoir transmis tes méthodes de travail et surtout ta bonne humeur !

Merci à Elsa Suberbielle, pour nos nombreuses discussions sur les intérêts particulièrement méconnus des parcours atypiques. Merci de m'avoir aidé à appréhender le fonctionnement cryptique du monde de la recherche et de m'avoir conseillé de foncer au moment opportun.

Merci à Daniel Dunia, vous avez été un support solide depuis le Master 2. Merci pour votre disponibilité à toute épreuve ainsi que vos conseils avisés : votre aide m'a été précieuse tant pour me lancer dans cette thèse que pour mon futur professionnel.

Merci à Abdel Saoudi, vous avez été un parrain de thèse disponible et à l'écoute. Merci pour nos rencontres trimestrielles et votre esprit de synthèse.

Merci à Bruno Segui et Sara Salinas. Vos retours en tant que membres de mon comité de thèse ont été précieux pour affiner les directions de recherche prioritaires (c'est-à-dire toutes). Merci encore pour votre temps, vos retours critiques et vos conseils. Merci également à Sophie Laffont-Pradines d'avoir participé à mon comité de thèse et pour votre aide à mon arrivée dans le laboratoire.

Je remercie tous les membres de l'équipe Vinedys, pour l'ambiance, les rires (et le travail aussi).

Merci à Mélinda Bénard. Merci pour ton support et ta tranquillité dans la réalisation de la collection biologique Neuroplex, j'ai beaucoup apprécié de travailler avec toi. A bientôt pour le lait ? Merci à Marion Groussolles, pour ta rigueur et tes nombreux conseils.

Merci à mes co-thésards historiques. Florent Marty, le jeune docteur en virologie et GRS, merci pour ton accueil et ton aide dès mon arrivée en Master 2. Benjamin Schmitt, merci pour la biblio et tes idées permanentes de manips. Yami Chin, thanks for making me travel, I hope you enjoy Toulouse. Il me tarde de voir vos thèses !

Merci à Charlène Martin d'avoir choisi de continuer développer ce travail de recherche. Je te confie Neuroplex. Bonne thèse à toi !

Merci à Charlotte Paut, je suis très contente d'avoir travaillé avec toi, merci pour ton temps et nos discussion bien drôles.

Merci bien sûr à Fred Sueur, Karine Bourgade, Anne Thouard et Raphaël Boursereau. TeamVinedys power, merci pour votre aide et pour l'ambiance.

Merci à Gisela d'Angelo, pour m'avoir accueillie avec bonne humeur et énergie à Curie afin de m'apprendre les bases de la microscopie électronique. Merci à Graca Raposo, Isle Hurbain et Maryse Romao pour leur temps et leurs conseils.

Je tiens à remercier tous les soignants de Paule de Viguier qui ont rendu possible la mise en place de la collection biologiques Neuroplex. Merci aux sages-femmes, infirmiers, médecins, AS qui ont pris de leur temps pour nous permettre de faire de la recherche sur le CMV. Merci particulièrement aux équipes des blocs obstétrical et gynécologique et du CPDPN. Merci également à tous les membres de la Germethèque Toulouse, Nathalie Moinard, Louis Bujan et Mélanie Aubry pour leur support essentiel.

Merci à toutes les sages-femmes qui m'ont appris la patience, la rigueur et l'humilité.

Merci à Heitor Correa pour son beau travail de fresque !

Merci à Damien Dubois, de m'avoir soutenu pendant ma première expérience de recherche.

Merci à Marianne Leruez-Ville pour son accueil à Necker lors de mon tout premier stage !

Merci à Isabelle Saves pour son temps et ses conseils avisés.

Merci à Monique Courtade de m'avoir encadré en tant qu'enseignant assistant.

Merci à tous les membres d'INFINITy qui ont participé à ce travail de recherche et qui m'ont aidé aux cours de ces 3 années de thèse.

Merci à Camille Petitfils, Marie Armani et Nadine Serhan pour tout le support, les discussions et les saisons de LMP que nous avons partagés. C'est précieux.

Merci à Ana Espino et Vincent Cantaloube, vive la team viro !

Un énorme merci à ma team SF. Juliette, Laurine, Camille, Jeanne, Marine et Lisa. Merci pour ces folles années, ces fous rires et tous les bons moments ! Mention spéciale pour Martin et Naël que j'adore voir grandir.

Merci aux « Fêtes de Bayonne » ! Clémence, Thibault, Trannoy, Tom, Loïc, Mathieu, Audrey, Flora, Chati, Théo, Pedro, Angé, Aymeric, Miral, Cindy, je suis très heureuse de vous avoir tous rencontré et de tous les moments géniaux qu'on passe ensemble. C'est précieux pour moi de pouvoir compter sur vous, je vous remercie pour votre support et vos blagues !

Merci aux anciens de PdF, Éléonore, Anne-Sophie, Charlotte, on a bien grandi en 10 ans !

Merci à Medhi, Aurélie, Fred, Violette, Simon et Ségolène pour vos pensées et vos conseils.

Merci à Franck et Sylvie, pour votre accueil, votre support et le jardin.

Merci à Christophe et Françoise, votre accueil bienveillant a joué un rôle essentiel. Merci.

Merci à Yodyssey pour les voyages, les cheveux salés et les nouvelles perspectives.

Marc,

Manon,

Suzanne,

Et Flora,

Mes boussoles. Votre tranquillité, votre finesse, votre honnêteté et votre humour sont fondateurs. Merci.

Merci à ma famille, de sang et de cœur.

Ceux qui sont présents et ceux qui sont partis, un peu en avance ou juste à l'heure.

Merci à Annabelle, ma grand-mère Merci à Valentina, ma mère Merci à Christophe, mon père Merci à Jean, mon pépé

Merci Matthieu *

*tmtc pour nos discussions, nos rires, nos projets, nos mardis, bref : ton support inconditionnel.

<u>Résumé</u>

L'infection congénitale par le Cytomégalovirus humain (hCMV) constitue une problématique majeure de santé publique. Dans les pays dits développés, c'est la première cause d'atteintes neurosensorielles néonatales d'origine infectieuse. L'infection par le hCMV induit des lésions placentaires et cérébrales chez le fœtus, d'intensité très variable. Les mécanismes physiopathologiques conduisant aux lésions fœtales restent toutefois peu compris. Par ailleurs, le suivi médical de cette infection en cours de grossesse est rendu complexe par le manque d'outils diagnostics et pronostics non invasifs.

La production de certains médiateurs par le placenta infecté pourrait expliquer en partie la typologie des atteintes retrouvées au niveau fœtal. Parmi ces médiateurs, les petites vésicules extracellulaires (sEV) placentaires transmettent des informations biologiques dans les compartiments maternel et fœtal. Ces nanovésicules lipidiques, chargées entre autres en protéines et miARN, présentent donc un intérêt particulier dans le cadre de l'infection congénitale par le hCMV, car elles pourraient 1/ jouer un rôle dans la transmission d'informations biologiques depuis le placenta infecté vers le fœtus et 2/ permettre, *via* leur présence dans le compartiment plasmatique maternel, de développer des biomarqueurs permettant de monitorer les grossesses positives pour le hCMV.

Au cours de ma thèse j'ai cherché à évaluer ces deux hypothèses, en combinant des modèles cellulaires trophoblastique, d'explants placentaires *ex vivo* et des prélèvements cliniques *in vivo*. Dans un premier temps, mes résultats ont montré que l'infection par le hCMV modifie la sécrétion et la composition des sEV trophoblastiques, qui présentent notamment un profil protéique théoriquement facilitateur d'infection. Par la suite, j'ai montré que ces sEV trophoblastiques modifiées par le hCMV exercent un effet proviral sur des cellules fœtales naïves de toute infection (fibroblastes et cellules souches neurales). Cet effet proviral sur le taux d'infection des cellules souches neurales naïves est également retrouvé avec des sEV issues de placenta précoce infecté *ex vivo* par le hCMV et avec des sEV issues de liquide amniotique de patientes enceintes présentant une séroconversion hCMV.

Par ailleurs, j'ai développé une collection biologique visant à prélever différents échantillons chez des patientes présentant une séroconversion hCMV en cours de grossesse. Les deux objectifs de ce biobanking sont de pouvoir valider nos résultats très fondamentaux avec des prélèvements cliniques et, d'autre part, de poser les bases permettant à terme de mettre au point un biomarqueur pronostic de suivi des grossesses positives au hCMV.

Dans son ensemble, ce travail propose que les sEV placentaires pourraient participer aux atteintes fœtales observées au cours de l'infection congénitale par le hCMV en facilitant la dissémination virale *via* une modification de leur composition induite par le virus. Par ailleurs, les sEV placentaires présentes au niveau plasmatique chez la mère pourraient être des candidats de choix dans le développement de nouveaux biomarqueurs pronostiques.

Abstract

Congenital infection by human Cytomegalovirus (hCMV) is a major public health issue. In so-called developed countries, it is the leading cause of neonatal neurosensory defects of infectious origin. Infection by hCMV induces placental and fetal brain lesions of variable intensity. The pathophysiological mechanisms leading to fetal damage, however, remain poorly understood. In addition, the medical monitoring of this pregnancy infection is complicated by the lack of non-invasive diagnostic and prognostic tools.

The production of certain mediators by the infected placenta could partly explain the type of fetal damages. Among these mediators, the placental small Extracellular Vesicles (sEV) transmit biological information both in maternal and fetal compartments. These lipid nanovesicles, loaded with proteins and miRNA, are therefore of particular interest in the context of congenital hCMV infection, because they could 1 / play a role in the transmission of biological information from the infected placenta to the fetus and 2 / allow, *via* their presence in the maternal plasma, the development of biomarkers monitoring hCMV positive pregnancies.

During my thesis, I sought to evaluate these two hypotheses, by combining trophoblastic cell models, *ex vivo* placental explants and *in vivo* clinical samples. First, my results showed that infection by hCMV modifies the secretion and composition of trophoblastic sEVs, which express a protein profile theoretically facilitating infection. Subsequently, I showed that these trophoblastic sEVs modified by hCMV exert a proviral effect on fetal cells naive of any infection (fibroblasts and neural stem cells). This proviral effect on the rate of infection of naive neural stem cells is also found with sEV from early placenta infected *ex vivo* and with sEV from amniotic fluid from pregnant patients with hCMV seroconversion.

In addition, I developed a biobank composed of different samples from patients experiencing hCMV seroconversion during pregnancy. The two objectives of this biobank are to validate our fundamental results with clinical samples, and on the other hand, to ultimately develop a prognostic biomarker to monitor hCMV positive pregnancies.

Taken as a whole, this work suggests that placental sEVs could participate in fetal damage observed during congenital hCMV infection, *via* a modification of their composition induced by the infection, by facilitating viral dissemination. In addition, the placental sEVs present in the mother's plasma could be prime candidates in the development of new prognostic biomarkers.

Conflit d'intérêts

Absence de conflit d'intérêts à déclarer

Financements

Bourse de thèse du Ministère de l'enseignement supérieur et de la recherche

Laboratoire soutenu par le CNRS, l'INSERM et l'Université Toulouse-III-Paul Sabatier Agence de la Biomédecine Réseau mère-enfant de la Francophonie Société Française de Néonatalogie



Abréviations

- ADN = Acide DésoxyriboNucléique
- ARN = Acide RiboNucléique
- BAC = Chromosome Bactérien Artificiel
- C19MC = Chromosome 19 miRNA Cluster
- CPDPN = Centre PluriDisciplinaire de Dépistage Prénatal
- EBV = Virus Epstein Barr
- ESCRT = Complexes de tri endosomiques requis pour le transport (Endosomal Sorting
- Complex Required for Transport)
- EV = Vésicule Extracellulaire (Extracellular Vesicle)
- gB = glycoprotéine d'enveloppe virale hCMV B
- gH = glycoprotéine d'enveloppe virale hCMV H
- hCMV = CytoMégaloVirus humain
- β HCG = Hormone Gonadotrophine Chorionique Humaine
- HIPEC = Human Invasive Proliferative Extravillous Cytotrophoblast
- HPV = Papilloma Virus Humain
- HSV = Herpes Simplex Virus
- IgG = Immunoglobulines G
- IgM = Immunoglobulines M
- IMG = Interruption Médicale de Grossesse
- ISEV = Société Internationale des Vésicules Extracellulaires (International Society of

Extracellular Vesicles)

- IRM = Imagerie par Résonnance Magnétique
- IVG = Interruption Volontaire de Grossesse
- kpb = kilo paires de bases
- IEV = grande Vésicule Extracellulaire (large Extracellular Vesicle)

LIS1 = protéine Lissencéphie-1, codée par PAFAH1B

- MCP = protéine majeure de capside du Cytomégalovirus (Major Capsid Protein)
- MIEP = promoteur majeur d'immediate early (Major Immediate Early Promoter)
- miRNA = micro ARN
- MFIU = Mort Fœtale In Utero
- MOI = Multiplicité d'Infection (Multiplicity Of Infection)

- MRC5 = lignée de fibroblastes fœtaux pulmonaires immortalisés
- MVB = corps multivésiculaire (MultiVesicular Body)
- NSC = Cellule Souche Neurale (Neural Stem Cell)
- NTA = Analyse de nanoparticules (Nanoparticle Tracking Analysis)
- PCR = réaction de polymérisation en chaîne (Polymerase Chain Reaction)
- PLAP = phosphatase alcaline placentaire (Placental Alkaline Phosphatase)
- $PPAR\gamma = Peroxisome Proliferator-Activated Receptor Gamma$
- RCIU = Retard de Croissance Intra-Utérin
- sEV = petite Vésicule Extracellulaire (small Extracellular Vesicle)
- SIDA = Syndrome d'ImmunoDéficience Acquise
- siARN = petit ARN interférent (small interfering RNA)
- SNC = Système Nerveux Central
- SVF = Sérum de Veau Fœtal
- TLR = récepteur "tool like" (Tool Like Receptor)
- $TNF\alpha$ = facteur de nécrose tumorale alpha (Tumor necrosis factor α)
- VIH = Virus de l'Immunodéficience Humaine
- VSV = Virus de la Stomatite Vésiculeuse

Liste des figures :

- Figure 1 : Classification des Herpes virus
- Figure 2 : Histoire naturelle de l'infection par le Cytomégalovirus
- Figure 3 : Particule virale du Cytomégalovirus
- Figure 4 : Génome du Cytomégalovirus
- Figure 5 : Cycle viral du Cytomégalovirus
- Figure 6 : Mécanismes d'entrée du Cytomégalovirus
- Figure 7 : Latence et réactivation du Cytomégalovirus
- Figure 8 : Séroprévalence du Cytomégalovirus chez les femmes en âge de procréer
- Figure 9 : Taux d'infection congénitale à Cytomégalovirus
- Figure 10 : Causes de séquelles à long terme chez les enfants aux Etats-Unis
- Figure 11 : Histoire naturelle de la primo-infection à Cytomégalovirus en cours de grossesse
- Figure 12 : Primo-infections et infections non primaires
- Figure 13 : Interface fœto-placentaire
- Figure 14 : Explants trophoblastiques de placenta de premier trimestre
- Figure 15 : Mécanismes des atteintes placentaires de l'infection par le Cytomégalovirus
- Figure 16 : Fréquence des lésions dans la population des nouveau-nés infectés
- Figure 17 : Atteintes cérébrales liées à l'infection congénitale par le Cytomégalovirus
- Figure 18 : Mécanismes neuro-pathogéniques impliqués dans l'infection congénitale
- Figure 19 : Cellules souches neurales humaines
- Figure 20 : Profil d'expression des immunoglobulines
- Figure 21 : Algorithme de prise en charge de l'infection congénitale par le Cytomégalovirus
- Figure 22 : Candidats vaccins contre le Cytomégalovirus
- Figure 23 : Découverte historiques des « endosomes multivésiculaires »
- Figure 24 : Vésicules extracellulaires / exosomes
- Figure 25 : Populations de vésicules extracellulaires
- Figure 26 : Biogénèse et composition des petites vésicules extracellulaires
- Figure 27 : Mécanismes de biogénèse des petites vésicules extracellulaires
- Figure 28 : Sécrétion des petites vésicules extracellulaires

- Figure 29 : Petites vésicules extracellulaires placentaires en IEM
- Figure 30 : Illustration des données de Nanoparticle Tracking Analyzis
- Figure 31 : Composition schématique des petites vésicules extracellulaires
- Figure 32 : Illustration des techniques de purification des vésicules extracellulaires
- Figure 33 : Effets biologiques des petites vésicules extracellulaires
- Figure 34 : Les défis à relever dans le champ des vésicules extracellulaires
- Figure 35 : Barrière placentaire et passage des vésicules extracellulaires
- Figure 36 : Barrière hémato-encéphalique et passage des vésicules extracellulaires
- Figure 37 : Similarités structurales entre virions et vésicules extracellulaires
- Figure 38 : Parcours intracellulaire des vésicules extracellulaires et des virus
- Figure 39 : Effets proviral et antiviral des petites vésicules extracellulaires
- Figure 40 : Manipulation par le Cytomégalovirus de la voie de biogénèse des vésicules
- Figure 41 : Interactions entre autophagie et biogénèse des vésicules extracellulaires
- Figure 42 : Place des petites vésicules extracellulaires dans la communication maternofœtale
- Figure 43 : Vésicules extracellulaires et pathologies de la grossesse
- Figure 44 : Vésicules extracellulaires en thérapeutique

INTRODU	CTION	15
1 LECYT	OMEGALOVIRUS HUMAIN	16
	inéralités sur le Cytomégalovirus humain	
1.1. 06	Historique de la découverte du Cytomégalovirus humain	
1.1.1.	Taxonomie	
1.1.2.	Pathologies liées au Cytomégalovirus humain	
1.1.5.	Modes de transmission	
1.1. 4 .	noues de transmission	20
1.2. 50	structure du virion	
1.2.1.	Génome viral	
1.2.2.	Cycle viral	
1.2.3.	Cycle viral rénlicatif	
1.2.3.1.	Phase d'entrée	
1233	Phase très précoce	23
1234	Phase précoce	23
1235	Phase fardive	24
1.2.3.5.	Latence et réactivation	25
1241	Latence	25
1.2.4.2.	Réactivation	
1.2.5.	Tropisme cellulaire	
1.2.6.	Souches virales	
1.3. Int	ection congénitale à Cytomégalovirus humain	
131	Enidémiologie de l'infection congénitale	28
1.3.2.	Généralités sur l'infection congénitale	
1.3.3.	Physiologie placentaire	
1.3.3.1.	Origine embryonnaire et modèles placentaires	
1.3.3.2.	Fonctions physiologiques du placenta	
1.3.4.	Atteintes placentaires liées à l'infection congénitale par le Cytomégalovirus	
1.3.5.	Atteintes cérébrales liées à l'infection congénitale par le Cytomégalovirus	
1.3.6.	Autres atteintes liées à l'infection congénitale par le Cytomégalovirus	
1.3.7.	Prise en charge médicale de l'infection congénitale par le Cytomégalovirus	
1.3.7.1.	Diagnostic, pronostic et suivi	44
1.3.7.2.	Traitements	
2. Les ves	ICULES EXTRACELLULAIRES	
2.1. Gé	néralités sur les vésicules extracellulaires	
2.1.1.	Historique de la découverte des vésicules extracellulaires	
2.1.2.	Types de vésicules extracellulaires et sémantique	
2.1.2.1.	Sémantique	
2.1.2.2.	Populations de vésicules extracellulaires	
2.1.3.	Biogénèse et sécrétion des petites vésicules extracellulaires	
2.1.3.1.	Biogénèse	
2.1.3.2.	Sécrétion	
2.1.4.	Structure et composition des petites vésicules extracellulaires	
2.1.4.1.	Structure	
2.1.4.2.	Composition	59
2.1.5.	Défis liés à la purification et à l'étude des sEV	
2.2. Ph	ysiopathologie et vésicules extracellulaires	
2.2.1.	Principales fonctions des petites vésicules extracellulaires	
2.2.2.	Biodistribution des petites vésicules extracellulaires	66
2.2.2.1.	Barrière placentaire	66
2.2.2.2.	Barrière hémato-encéphalique	
2.2.3.	Vésicules extracellulaires et infections virales	69
2.2.3.1.	Similarités de structure et de biogénèse	69
2.2.3.2.	Impact des vésicules extracellulaires au cours d'infections virales	
2.2.3.3.	Interaction entre vésicules extracellulaires et virus : exemples choisis	

	2.2.3.4. Interactions entre le Cytomégalovirus et les vésicules extracellulaires	75
	2.2.4. Petites vésicules extracellulaires et grossesse	80
	2.2.4.1. Effets physiologiques des vésicules extracellulaires placentaires	80
	2.2.4.2. Trafic et internalisation des vésicules extracellulaires trophoblastiques	83
	2.2.4.3. Normalisation des vésicules extracellulaires placentaires	84
	2.2.5. Vésicules extracellulaires placentaires et pathologies infectieuses	
	2.2.6. Petites vésicules extracellulaires et applications biomédicales	
	2.2.6.1. Les vésicules extracellulaires comme outil therapeutique	86
0.0		
OR'	ECTIFS ET HYPOTHESES	90
RES	ULTATS	93
1.	IMPACT DE L'INFECTION PAR LE CYTOMEGALOVIRUS SUR LES PETITES VESICULES EXTRACELLULAIF	RES
TRO	PHOBLASTIQUES ET CONSEQUENCES SUR LES CELLULES FŒTALES	93
	1. Article « Le Cytomégalovirus humain modifie la sécrétion et la composition des petites vésic	cules
	extracellulaires trophoblastiques, favorisant ainsi l'infection des cellules fætales receveuses »	93
	2. Données non publiées et expérimentations en cours	136
2.	IMPACT DE L'INFECTION PAR LE CYTOMEGALOVIRUS SUR LES PETITES VESICULES EXTRACELLULAIF	RES
ISS	JES D'EXPLANTS PLACENTAIRES EX VIVO	137
	2.1. Article : « Le hCMV modifie l'expression de marqueurs de surface des petites vésicules	
	extracellulaires isolées d'histocultures placentaires de premier trimestre »	137
	2.2. Perspectives de l'article «Human Cytomegalovirus infection changes the pattern of surface	
	narkers of small extracellular vesicles isolated form first trimester placental histocultures »	154
3.	COLLECTION BIOLOGIOUE « NEUROPLEX »	154
סומ	CUSSION FT DEDSDECTIVES	150
DIG		137
RE	TERENCES	169
AN	VEXES	182
1.	ANNEXE 1 : DONNEES CLINIOUES « NEUROPLEX »	182
2.	ANNEXE 2 : NOTE D'INFORMATION POUR LES PATIENTES « NEUROPLEX »	183
3.	ANNEXE 3 : PRISE EN CHARGE DES PATIENTES « NEUROPLEX »	184
4	ANNEXE 4 : CHECK-LISTE DE L'ACCOUCHEMENT « NEUROPLEX »	185
5	ANNEXE 5 : ARTICLE "HUMAN CYTOMEGALOVIRUS INFECTION IS ASSOCIATED WITH INCREASED	100
EXI	RESSION OF THE LISSENCEPHALY GENE PAFAH1B1 ENCODING LISTIN NEURAL STEM CELLS AND	
CO	JGENITALLY INFECTED BRAINS"	186
6	ANNEXE 6 · FRESOUE / MA THESE SUR UN MUR	198
0.	TWINEAR O. TRESQUET MATTIESE SUR UN MUR	170

INTRODUCTION

INTRODUCTION

Le Cytomégalovirus humain (hCMV) est un virus strictement humain, présentant une distribution mondiale. L'infection par le hCMV est asymptomatique chez l'adulte immunocompétent, mais peut induire de graves lésions chez des patients immunodéprimés ou chez le fœtus en cas d'infection en cours de grossesse. Dans les pays dits développés, l'infection congénitale par le hCMV reste la cause la plus fréquente d'infections congénitales et de lésions neurosensorielles. De plus, le hCMV possède un tropisme ubiquitaire et induit donc un panel de symptômes très variables, ce qui complique la prise en charge médicale sur les versants diagnostics comme pronostics. Dans ce travail de thèse, nous nous intéresserons spécifiquement à l'infection congénitale par le hCMV, une problématique majeure de santé publique en France, silencieuse malgré sa forte prévalence et partiellement comprise au niveau physiopathologique (Gandhi & Khanna, 2004). Une meilleure compréhension des mécanismes biologiques fondamentaux impliqués au cours de l'infection congénitale reste essentielle afin de proposer des axes de recherche plus appliqués qui pourraient permettre à terme d'en améliorer la prise en charge. Les vésicules extracellulaires (EV) placentaires, des médiateurs biologiques produits par le placenta, permettent une communication entre le versant maternel et le versant fœtal. L'étude des EV, en tant que modulateurs biologiques et en tant que biomarqueurs potentiels, est en plein essor au niveau mondial, grâce notamment à des progrès technologiques galopants et à une communauté de recherche très active (Théry et al., 2018). L'objectif de mon travail de thèse a été d'étudier ces vésicules extracellulaires placentaires au cours de l'infection par le hCMV, en analysant d'une part l'impact du virus sur leur sécrétion et leur composition, et d'autre part l'effet de ces vésicules extracellulaires placentaires sur la biologie des cellules fœtales au cours d'une infection par le hCMV. En suivant j'ai cherché à étudier l'impact de ces EV au plus proche de la physiopathologie clinique en réalisant des expériences sur explants placentaires *ex-vivo* et en constituant une collection biologique d'échantillons issus de patientes enceintes en séroconversion hCMV.

La présentation du contexte soutenant ce travail de thèse s'articulera en deux parties : tout d'abord une présentation du hCMV sur les versants virologiques et biologiques ainsi qu'un focus sur l'infection en cours de grossesse et, dans un deuxième temps, une description de l'état des connaissances concernant les vésicules extracellulaires, dans les contextes spécifiques de la grossesse et des infections virales.

1. Le Cytomégalovirus humain

1.1. Généralités sur le Cytomégalovirus humain

1.1.1. Historique de la découverte du Cytomégalovirus humain

La découverte du hCMV a été précédée, comme c'est fréquemment le cas pour les maladies infectieuses, par la description d'un panel de symptômes. En 1881 H. Ribberts décrit de très grandes cellules présentant des inclusions dans des coupes rénales et de parotide de fœtus décédés in utero (MFIU), de ce qu'il suppose être la syphilis. Sur une cohorte de 25 morts fœtales in utero présentant des pétéchies, hépatosplénomégalies et calcifications intracérébrales décrite par JP. Wyatt en 1932, ce dernier retrouve chez 100% des cas des cellules à inclusion nucléaires semblables à celles décrites par Ribberts. A ce stade l'étiologie virale de la maladie n'est pas encore envisagée. Grâce aux progrès réalisés en culture cellulaire, T. Weller isole en 1957 à partir de cellules embryonnaires une souche virale issue d'un fœtus suspecté d'être décédé d'une infection congénitale à toxoplasmose. En parallèle M. Smith isole également une souche virale ressemblante à partir de glandes salivaires adultes présentant des grosses cellules à inclusions. En collaboration avec T. Weller, WP. Rowe isole ce qu'il pense être le virus responsable de la varicelle mais qui est en fait la même souche virale : celle du virus qui cause la « maladie des inclusions cytoplasmiques ». Trois groupes de recherche ont donc en parallèle mis en évidence une même souche virale qui, en 1960, est nommée Cytomégalovirus, selon son effet cytomégalique (Ho, 2007).

La recherche sur le Cytomégalovirus débute alors plus formellement : identifications de différentes souches virales, spécificité d'espèce, études sérologiques de prévalence et mécanismes virologiques.

1.1.2. Taxonomie

Le genre Cytomégalovirus est un groupe de virus appartenant au groupe I (virus à ADN double brin), à l'ordre des *Herpesvirales*, à la famille des *Herpesviridae* et à la sous-famille des *Betaherpesvirinae* (Figure 1). La taxonomie précise de l'espèce virale communément appelée Cytomégalovirus humain est : *Betaherpesvirus* humain 5 (*International Committee on Taxonomy of Viruses (ICTV)*, s. d.).

Identification			Génome	
Désignation	Nom usuel (abréviation anglo-saxonne)	Sous-famille	Taille (kpb)	
HHV-1	Herpès simplex 1 (HSV-1)	α	152	
HHV-2	Herpès simplex 2 (HSV-2)	α	152	
HHV-3	virus de la varicelle (VZV)	α	125	
HHV-4	Virus d'Epstein Barr (EBV)	γ	172	
HHV-5	Cytomégalovirus Humain (HCMV)	β	248	
HHV-6 A	roseolovirus	β	159	
HHV-6-B	roseolovirus	β	162	
HHV-7		β		
HHV-8	virus du sarcome de Kaposi (KSHV)	α	230	

Figure 1 : Famille des herpes virus infectant l'Homme (Davison et al., 2009).

1.1.3. Pathologies liées au Cytomégalovirus humain

Asymptomatique chez l'adulte immunocompétent, l'infection par le hCMV peut induire de graves pathologies chez les patients immunodéprimés ou chez le fœtus en cours de grossesse. L'histoire naturelle de l'infection débute par une primo-infection *via* différents modes de transmission (fluides biologiques, iatrogène...) qui va induire une virémie. En cours de primo-infection non contrôlée, le virus va passer de manière transitoire en phase de réplication active (productive) avant de débuter une phase de latence (Gandhi & Khanna, 2004). En effet, le hCMV appartient à la famille des *Herpesviridae* et possède donc la capacité de rester latent durant de longues périodes au sein de cellules réservoirs, présentant une transcription virale minimale et de fait se maintient « caché » du système immunitaire de l'hôte. Certains évènements immuno-déprimants (maladies, immunodépression pré-greffe induite, état d'immunosuppression relative lors de la grossesse) peuvent alors induire une sortie de phase de latence, et une réactivation virale avec un cycle de réplication active (Forte et al., 2020). D'autres part, les souches de hCMV étant nombreuses, il existe des cas de réinfections possibles avec une souche différente de celle de la primo-infection. L'histoire naturelle de l'infection par le hCMV et ses différentes étapes est illustrée dans la Figure 2 ci-dessous.



Figure 2 : Schéma de l'histoire naturelle de l'infection par le hCMV

Quelle que soit la cause (primo-infection, réactivation ou réinfection) conduisant à une réplication virale active et une virémie, les conséquences restent assez similaires. Chez les adultes immunocompétents, l'infection va être contrôlée très rapidement, elle est le plus souvent asymptomatique ou peut induire un syndrome pseudo-grippal non spécifique. Chez les patients immunodéprimés (traitements immunosuppresseurs, infection VIH au stade SIDA), le hCMV atteint un vaste spectre d'organes par son tropisme très large. On retrouve alors fréquemment des lésions ulcéreuses cutanées et intestinales, des encéphalites, des rétinites et des défaillances multi-viscérales gravissimes pouvant être mortelles. Concernant l'infection congénitale par le hCMV, sa physiopathologie sera décrite plus en détail dans la partie I.1.3.

En addition de ces pathologies d'infection « aigües », l'infection par le hCMV et les propriétés de latence de ce virus sont étudiées dans différentes pathologies que nous ne détaillerons pas. Le hCMV possède notamment plusieurs propriétés biologiques potentiellement onco-modulatrices (rôle anti-apoptotique, modulation de l'angiogenèse, ...), ou ayant un impact sur la sénescence vasculaire.

1.1.4. Modes de transmission

Le hCMV est excrété dans de nombreux liquides et fluides biologiques : sang, urines, selles, larmes, salive, mucus nasal, sécrétions cervico-vaginales, sperme et lait maternel. Les

modes de transmission peuvent donc être très variables. Le taux d'excrétion virale est variable en fonction du statut du patient infecté, l'excrétion virale sera importante en phase de primo infection ou de réactivation lorsque la réplication virale est active, mais très faible voire nulle en phase de latence. On assiste par exemple à une forte excrétion virale lors de la primoinfection chez des jeunes enfants, mais également chez des personnes âgées qui, dans un contexte d'immunodépression, subissent une réactivation virale souvent asymptomatique mais productive. Il existe une transmission horizontale fréquente chez les jeunes enfants lors du début de la vie en communauté *via* les sécrétions nasales et la salive (entre jeunes enfants, ou vers l'entourage proche). Cette phase de primo-infection à forte excrétion virale est responsable d'une grande part des séroconversions dans la population générale dans des pays dits développés (Cannon et al., 2014). La séroconversion en cours de grossesse est notamment fréquente chez les patientes séronégatives multipares, dont l'enfant aîné débute sa vie en collectivité.

Concernant l'infection congénitale par le hCMV, la transmission verticale mèreembryon se fait majoritairement par voie sanguine transplacentaire. Il existe des infections *intrapartum* (en cas d'infection active maternelle avec sécrétion de virus dans le tractus génital) et *via* le lait maternel qui peuvent être problématiques notamment chez les nouveau-nés prématurés.

La transmission sexuelle du hCMV, *via* les sécrétions vaginales, le sperme, la salive et les contacts muqueux est également avérée (Handsfield et al., 1985). L'utilisation du préservatif, féminin ou masculin, empêche cette transmission. Cette transmission sexuelle est une autre des voies de transmission conduisant à la diffusion du virus dans la population générale, notamment chez les jeunes adultes. La transmission sexuelle peut être problématique en cours de grossesse où il existe théoriquement un risque d'infection congénitale par voie ascendante vaginale.

La transmission peut également être iatrogène : par transfusion sanguine ou par greffe d'organe. Chez des patients immunodéprimés ou très jeunes (prématurés, nouveau-nés), ce transfert de virus peut déclencher une véritable maladie à hCMV et induire de graves atteintes. Dans le cas d'une infection post-transfusion, le transfert de hCMV peut se faire par deux mécanismes : transfert direct de virions infectieux si virémie ou bien par transfert de monocytes réservoirs contenant le virus sous forme latente. La présence de virions infectieux dans les dons de sang issus de la population générale adulte est heureusement rare. Toutefois, la séroprévalence de hCMV étant importante dans la population générale, le risque de transfert de hCMV latent au sein des monocytes n'est pas négligeable (Diosi et al., 1969). Depuis les années 1990, la prévention de la transmission du hCMV aux nouveau-nés (à terme ou prématurés) se fait par la transfusion de poches de sang déplétées en leucocytes (Eisenfeld et al., 1992).

1.2. Structure et biologie du Cytomégalovirus humain

1.2.1. Structure du virion

La particule virale du hCMV, de type sphérique, mesure entre 150 et 200nm de diamètre. Ce virus enveloppé comporte une capside virale icosaédrique (162 capsomères) contenant le matériel génétique viral. A l'extérieur de la capside, on trouve le tégument composé de protéines virales et cellulaires embarquées. Et enfin vers l'extérieur l'enveloppe virale d'origine cellulaire contient des glycoprotéines virales (gB, gH...) (Figure 3).



Figure 3 : Structure de la particule virale du hCMV. ViralZone

1.2.2. Génome viral

Le génome du hCMV est une molécule d'ADN linéaire double brin de longue taille (≈ 235 kpb). Il n'existe pas de consensus sur le nombre de cadres de lecture total du virus, ni sur le nombre de protéines produites. En effet, les processus de transcription du hCMV sont variés et complexes, notamment en fonction des types cellulaires ou des états d'infection (productive ou latente) (Gatherer et al., 2011). Le nombre minimal de cadres de lecture ouverts admis jusqu'à récemment était de 200. En 2012, Stren-Ginossar *et al.* ont montré par des méthodes

d'analyse de transcrits que le hCMV pouvait présenter plus de 700 cadres de lecture (Stern-Ginossar et al., 2012).

Le génome du hCMV possède deux régions uniques : une région unique longue (Unique Long : UL) et une région courte (Unique Short : US). De part et d'autre on retrouve les séquences terminales répétées (Terminal Repeat TR) : respectivement TRS côté US et TRL côté UL. L'assemblage entre les séquences US et UL se fait par une répétition inversée de TRL et TRS : IRL et IRS (internal repeat long : IRL et internal repeat short : IRS). Cette organisation du génome est présentée de manière schélatique dans la figure 4. Le nom des gènes issus des cadres de lecture est défini selon leur position dans les différentes séquences (UL1, US1...) (Mocarski Jr., 2007).

HCMV (~235Kb)	TRL	UL	IRL	IRS	US	TRS
---------------	-----	----	-----	-----	----	-----

Figure 4 : organisation génomique schématique du hCMV (Crough & Khanna, 2009).

1.2.3. Cycle viral

1.2.3.1. Cycle viral réplicatif

La biologie du hCMV *in vivo* alterne des cycles réplicatifs, des phases de latence et des épisodes de réactivation.

Au cours d'un cycle viral classique d'une primo-infection, les particules virales de hCMV interagissent *via* leurs glycoprotéines virales avec des récepteurs cellulaires conduisant à leur internalisation (Figure 5.1). Le contenu du tégument ainsi que la capside sont relargués dans le cytosol. Certaines protéines virales débutent immédiatement leur rôle immunorégulateur et promoteur de réplication virale (Figure 5.2). La capside est transportée dans le noyau cellulaire et y largue le génome qui y est alors circularisé (Figure 5.3). L'expression des gènes viraux débute par les gènes très précoces IE (Immediate Early), suivis des gènes retardés précoces DE (Delayed Early) et enfin les gènes tardifs L (Late). L'expression des gènes tardifs induit dans le noyau l'assemblage génomique au sein des capsides puis leur sortie dans le cytosol. Au sein du cytosol la capside s'associe aux protéines du tégument néoformées et cette structure immature est dirigée vers l'usine d'assemblage virale (sites d'assemblages intracellulaires formés notamment par l'appareil de Golgi et le complexe

endosomal) (Figure 5 .4). La capside s'additionne alors d'autres protéines du tégument et s'entoure de l'enveloppe virale par bourgeonnement dans des vésicules intracellulaires de l'usine d'assemblage virale. Les particules virales complètes (capside comprenant le matériel génétique viral, protéines du tégument virales et cellulaires et enveloppe) sont alors sécrétées dans le milieu extracellulaire (Figure 5.5) (Beltran & Cristea, 2014; Crough & Khanna, 2009).



Figure 5 : Cycle viral productif du hCMV. Phases très précoces, précoce et retardées du cycle viral productif (IE=immediate early ; E=early, L=late). D'après (Manandhar et al., 2019).

1.2.3.2. Phase d'entrée

La phase d'entrée du virion dans la cellule se compose de plusieurs étapes. L'entrée virale peut se faire par fusion des membranes virales et cellulaires à la surface ou après un processus d'endocytose. En premier lieu l'interaction entre la particule virale et la cellule est non spécifique (notamment *via* des héparane-sulfates). La liaison devient spécifique *via* la fixation à des récepteurs, variables selon le type cellulaire (PDGFR-a, EGF-R, DC-SIGN, TLR-2...). Les glycoprotéines virales (gB, gH, complexe pentamérique) se lient alors avec des intégrines et initient la signalisation cellulaire conduisant à l'internalisation du virion. La fixation des glycoprotéines virales sur des récepteurs cellulaires variés (TLR...) peut induire avant même l'internalisation du virion des effets immuno-régulateurs ou immuno-

manipulateurs. Les glycoprotéines virales sont hautement conservées, elles sont essentielles à la fusion et l'entrée virale (Gardner & Tortorella, 2016; Vanarsdall & Johnson, 2012).

La fusion de l'enveloppe virale avec la membrane plasmique induit la libération dans le cytosol de la capside virale et du tégument. Les protéines présentes dans le tégument peuvent être d'origine virale mais également d'origine cellulaire (incluses dans la particule virale au moment de son enveloppement dans la cellule d'origine productrice du virion). Ces protéines du tégument relarguées dans le cytosol peuvent avoir un effet immédiat dès la fusion avec la cellule cible, notamment au niveau immun, en modifiant la signalisation cellulaire ou en facilitant la transcription virale *via* un adressage au noyau de la capside (Figure 6). Des protéines virales sont également adressées au noyau indépendamment de la capside. Deux protéines virales abondantes dans le tégument, pp65 et pp71, jouent un rôle respectivement dans l'évasion immunitaire et dans la mise en place de l'expression des gènes IE (ces protéines jouent également un rôle aux phases plus tardives du cycle viral) (Kalejta, 2008).



Figure 6 : Processus de fusion virale, relargage des protéines du tégument dans le cytoplasme et transfert dans le noyau (Kalejta, 2008).

1.2.3.3. Phase très précoce

La phase très précoce de réplication virale résulte en la production des protéines IE (Immediate Early), impliquées dans des processus variés, notamment la mise en place de la

transcription virale ainsi que l'instauration d'un environnement cellulaire propice à la réplication virale. Les deux phosphoprotéines nucléaires essentielles de cette phase, IE1 (72 kDa) et IE2 (86 kDa), sont sous le contrôle du MIEP (Major Immediate Early Promotor). Les rôles de IE1/2 sont variés : elles favorisent la réplication virale et la transcription de gènes viraux, elles modulent la transcription des gènes hôtes (notamment à visée immunotolérante) et inhibent le cycle cellulaire ainsi que l'entrée en apoptose. IE1 inhibe notamment l'activité méthyl transférase de ND10 et maintient ainsi un contexte chromatinien permissif à la réplication virale. IE1 et IE2 participent également à la tolérance immunitaire de la cellule cible, respectivement en diminuant l'ampleur de la réponse aux interférons et en inhibant la production de cytokines proinflammatoires (Paulus & Nevels, 2009). IE1 et IE2 ne jouent pas seulement un rôle dans le cycle viral réplicatif mais également au cours de l'initiation et du maintien de la latence.

D'autres protéines produites au cours de la phase très précoce, comme IRS1 et TRS1, limitent *via* une inactivation de la protéine kinase R la réponse cellulaire aux interférons et ainsi l'apoptose (Braggin et al., 2016).

1.2.3.4. Phase précoce

Les protéines synthétisées au cours de la phase précoce sont majoritairement impliquées dans la transcription virale (initiation de la réplication ADN-polymérase) afin d'amplifier le génome viral. En parallèle les gènes Early codent également pour des protéines « du tégument » comme pp65, pp71, pp150 pUL48 qui jouent des rôles de modulation immunitaire (pp65, pp71), et qui sont essentielles pour l'entrée virale et doivent être inclues dans les virions néoformés (Kalejta & Albright, 2020; Tomtishen III, 2012).

1.2.3.5. Phase tardive

La phase tardive correspond à la phase finale d'assemblage des néo-virions. C'est à cette phase que sont produites les protéines structurales capsidiques nécessaires à la formation des capsides et de leurs protéines associées. Les capsides sont assemblées au sein du noyau puis transportées vers le cytoplasme où elles rejoignent le complexe d'assemblage viral. Les protéines Late produites jouent des rôles dans le processus d'assemblage des particules virales

au sein des usines virales et le mécanisme d'enveloppement par bourgeonnement au sein de vacuoles dérivant de l'appareil de Golgi (trans-Golgi network) (Homman-Loudiyi et al., 2003). Au cours de l'enveloppement, des protéines virales, des protéines du tégument mais également des protéines cellulaires sont incluses dans l'espace tégumental entre la capside et l'enveloppe. Les particules virales complètes sont alors sécrétées dans le milieu extracellulaire. On note que certaines particules virales non fonctionnelles, des corps denses, peuvent également être produites et stockées au sein de la cellule (cytomégalique) ou sécrétées, sans avoir de potentiel infectieux.

1.2.4. Latence et réactivation

1.2.4.1. Latence

Le Cytomégalovirus humain appartient à la famille des *Herpesviridae* et possède donc une capacité de latence. Cette persistance virale très efficace s'établit à la suite de la primoinfection et perdure le long de la vie de l'individu infecté. A la différence d'un cycle réplicatif, au cours d'une mise en latence le virus ne se réplique pas, et il n'existe pas de production de nouveaux virions. Le matériel génétique du virus persiste dans le génome de cellules hôtes réservoirs sous forme épisomale. Les cellules réservoirs connues du hCMV sont les cellules souches hématopoïétiques CD34+ et les progéniteurs myéloïdes ; les précurseurs neuronaux et les cellules endothéliales sont quant à eux des réservoirs supposés. Par ailleurs, les multiples phénomènes permettant l'entrée et le maintien en latence ne sont à ce jour pas tous explicités (Forte et al., 2020).

Le mot clé décrivant le processus de latence est : manipulation. Le hCMV manipule sa cellule hôte, manipule la réponse immune et contrôle finement l'expression de ses transcrits afin d'assurer la réussite de ce camouflage au sein même de l'organisme infecté. Le nombre de transcrits est moindre par rapport à un cycle réplicatif, en partie par le maintien d'un haut degré de compaction chromatinienne (Figure 7) (Sinclair & Sissons, 2006). Le MIEP joue un rôle dans le maintien de la latence, son activation est limitée pendant la phase de latence par la présence de répresseurs transcriptionnels de l'hôte (HP1, KAP1). Le MIEP n'étant pas totalement inactivé, des transcrits de latence restent produits. Par exemple la protéine virale IE1 est nécessaire au maintien du génome viral sous forme épisomale *via* une interaction avec le facteur de transcription de l'hôte SP1 (Reeves & Sinclair, 2013).



Figure 7 : Représentation schématique des processus de latence et de réactivation au cours d'une infection par le hCMV (Goodrum, 2016).

1.2.4.2. Réactivation

La latence virale est ponctuée d'épisodes de réactivation périodique, asymptomatiques pour le patient infecté, mais qui permettent la production de virions, une virémie et la transmission à d'autres hôtes, après quoi se remettra en place l'équilibre de persistance virale chez l'hôte infecté. Il peut également se présenter en cas d'immunosuppression un épisode de réactivation important, non contrôlé conduisant à des symptômes potentiellement létaux (Collins-McMillen et al., 2018). La réactivation a lieu au sein des macrophages ou des cellules dendritiques lors de la différenciation des progéniteurs myéloïdes (Figure 7) (Dupont & Reeves, 2016). La réactivation est également un mode fréquent de transmission materno-fœtale chez les femmes séropositives pour hCMV, conduisant à des atteintes moins graves que les primoinfections mais importantes par leur nombre (sous-estimé) (Lanzieri et al., 2014).

A ce jour il n'est pas d'évènement connu qui déclencherait une réactivation du hCMV, il semblerait que l'initiation de la réactivation soit liée à un ensemble de processus viraux, cellulaires et dépendants de l'homéostasie de l'hôte. Tout évènement perturbant la relation virus-hôte (co-infection, switch immunitaire, traitement immunosuppresseur...) pourrait ainsi induire une rupture dans l'équilibre et provoquer une sortie de latence.

1.2.5. Tropisme cellulaire

Le hCMV peut infecter un éventail de cellules très large : cellules endothéliales, épithéliales, cellules du tissu conjonctif, fibroblastes, cellules hématopoïétiques, cellules musculaires lisses. Ce tropisme cellulaire vaste explique la facilité relative avec laquelle le virus infecte de nombreux organes et ainsi la grande variabilité des symptômes retrouvés dans les maladies à hCMV. Les principales cellules cibles de l'infection réplicative sont les cellules endothéliales et épithéliales. La latence virale s'établit quant à elle dans les progéniteurs hématopoïétiques myéloïdes de la moelle osseuse (présence du génome viral mais pas de cycle réplicatif). Au cours de la différenciation en monocytes et cellules dendritiques, il peut y avoir maintien de la latence ou réactivation virale. La présence de virus latent dans les monocytes, cellules ubiquitaires, entraîne une diffusion du matériel génétique viral dans tous les organes. Les cellules endothéliales et les progéniteurs neuronaux pourraient également être des cellules réservoirs du hCMV (pas de données *in vivo*) (Belzile et al., 2014; Dupont & Reeves, 2016; Sinzger et al., 2008). La latence peut donc se faire dans un grand nombre d'organes et conduire à des atteintes liées au hCMV des années après la primo-infection.

Le tropisme cellulaire est lié à l'expression de certaines protéines d'entrée virale (par exemple les gènes UL128-UL150 pour l'entrée dans les cellules épithéliales et endothéliales). Ceci explique le tropisme différent entre plusieurs souches virales (notamment dans les souches virales dites de laboratoire), des altérations dans le locus de gènes UL128-131 au sein de différentes souches de hCMV pouvant moduler leur capacité à infecter certains types cellulaires (Ryckman et al., 2006; Sinzger et al., 2008).

1.2.6. Souches virales

Les génotypes retrouvés chez les patients sont très variables, avec des processus de combinaisons/recombinaisons, mutations : de nombreuses souches virales de hCMV coexistent et circulent activement dans les populations. Cette diversité de souches est retrouvée chez les adultes comme chez les enfants et pourrait expliquer en partie les différents tropismes cellulaires, symptômes et réponses immunes rencontrés. Au sein d'un même individu, il existe des recombinaisons virales, plus importantes en cas d'infection par différentes souches de hCMV qu'en présence d'une unique souche virale (Suárez et al., 2019).

Concernant l'infection congénitale, le plus fréquemment une seule souche virale est retrouvée (identique chez la mère et le fœtus) et le passage transplacentaire ne semble pas être conditionné par un type spécifique de souche virale (Arav-Boger, 2015).

La souche de référence de hCMV est la souche Merlin. Pour l'étude des effets biologiques du virus on distingue globalement les souches dites de laboratoires, qui ont perdu certaines séquences au cours de leur nombreux passages (AD169 par exemple) mais permettent une comparabilité des analyses, et des souches dites cliniques, isolées à partir d'isolats cliniques qui reflètent la grande variabilité de souches circulant chez l'homme, qui ont un tropisme cellulaire conservé notamment pour les cellules endothéliales (VHL/E) (Wilkinson et al., 2015).

1.3. Infection congénitale à Cytomégalovirus humain

1.3.1. Epidémiologie de l'infection congénitale

La séroprévalence pour le hCMV est variable en fonction des zones géographiques, notamment selon l'état socio-économique. La séroprévalence peut aller de 50% de la population générale, dans les pays « du Nord », jusqu'à plus de 90% de la population générale dans des pays à plus faible niveau socio-économique (Cannon et al., 2010; Gkrania-Klotsas et al., 2013).

La séroprévalence au sein d'une population influe directement sur le risque de primoinfection, notamment en cours de grossesse, sur le risque de réactivation ainsi que sur le développement de pathologies associées (Gandhi & Khanna, 2004). La plupart des études de séroprévalence et de suivi des cas d'infection congénitale par le hCMV ont été réalisées dans des pays nord-américains et européens, et Lanzieri *et al.* concluent suite à leur méta-analyse que l'impact de l'infection congénitale par le hCMV dans les pays dits en voie de développement reste largement méconnu (Figure 8) (Lanzieri et al., 2014).



Figure 8 : Séroprévalence du hCMV dans la population des femmes en âge de procréer (Lanzieri et al., 2014).

La part de femmes en âge de procréer séronégatives pour le hCMV constitue la population la plus à risque de primo-infection en cours de grossesse et de transmission virale au fœtus. Toutefois, cette population à risque importante (50% des femmes en France) n'est que très peu informée sur l'infection congénitale et les risques associés. Dans des pays où la séroprévalence est plus importante, la majorité des infections congénitales sont liées à des phénomènes de réactivation ou de réinfection (Figure 9) (Leruez-Ville et al., 2020).

Variables	Leruez-Ville et al, 2017 ²³	Puhakka et al, 2018 ²⁰	Mussi Pinhata et al, 2018 ²⁵
Country	France	Finland	Brazil
CMV seroprevalence in pregnant women	60%	72%	98%
Neonates screened, n	11,715	19,868	1721
Prevalence of congenital CMV infection	0.37%	0.2%	0,5%
Proportion of congenital CMV infection following maternal primary infection	52%	47%	10%
Proportion of congenital CMV infection following maternal nonprimary infection	48%	53%	90%

Figure 9 : Séroprévalence chez les femmes en âge de procréer et taux d'infections congénitales à hCMV (Leruez-Ville et al., 2020).

L'infection congénitale à hCMV est la cause la plus fréquente de déficits neurosensoriels d'origine infectieuse congénitale. Cette infection touche en France entre 0,5 et 1 naissance vivante sur 100 (exclusion des fausses couches précoces et tardives, de morts fœtales et d'interruption médicales de grossesses) (Cannon, 2009; Leruez-Ville et al., 2020). L'infection congénitale par le hCMV induit des effets délétères à plusieurs niveaux. Tout d'abord on retrouve bien sûr l'effet péjoratif sur le développement fœtal, notamment au niveau cérébral, avec des lésions plus ou moins marquées sur le cerveau ou encore des atteintes neurosensorielles. Les lésions de type cécité et surdité peuvent apparaître des années après la naissance : les enfants développant ce type d'atteintes risquent un retard de diagnostic et de mise en place de traitements palliatifs à leurs défauts sensoriels, ceci risquant d'enkyster des handicaps à une période de développement neurologique intense. La grande variabilité des atteintes rend le pronostic très complexe, notamment en cours de grossesse. Cette incertitude quant au devenir du nouveau-né peut induire un stress parental majeur. Sur le plan social, les séquelles à long terme de l'infection congénitale par le hCMV induisent des nécessités de traitement et d'accompagnement du handicap très coûteuses sur les plans humain comme financier. Dans des pays comme les USA où les interruptions de grossesse pour atteintes fœtales sont rares, le nombre d'enfants présentant des lésions à long terme liées à une infection congénitale à hCMV est au moins aussi important que celui des enfants présentant des atteintes liées à une trisomie 21 (Figure 10).



Figure 10 : Principales causes de séquelles à long-terme chez les enfants (données annuelles aux USA) (Cannon et al., 2010).

L'infection congénitale à hCMV est donc un problème majeur de santé publique en France, à la fois compte tenu de sa forte prévalence, des lésions néonatales de sévérité variable associées et des difficultés de prise en charge médicales.

1.3.2. Généralités sur l'infection congénitale

L'infection congénitale se définit comme l'infection en cours de grossesse du fœtus par le hCMV. L'infection maternelle est généralement asymptomatique, elle peut conduire à un syndrome pseudo-grippal non spécifique, mais les lésions fœtales peuvent être majeures. Il existe deux modes de transmission du hCMV depuis la mère vers le fœtus. La plus décrite est la transmission sanguine, *via* les échanges sanguins au sein du placenta suite à une virémie maternelle. Une transmission virale ascendante depuis la filière génitale (vagin, sécrétions cervico-vaginales) est théoriquement possible mais très difficile à monitorer (Forman et al., 2017). De manière générale l'histoire de l'infection est la suivante : infection ou réinfection ou réactivation chez la femme enceinte avec virémie, infection du placenta et réplication virale active au niveau placentaire, transmission du virus au fœtus puis infection fœtale suivie ou non d'atteintes fœtales.

L'infection congénitale par le hCMV concerne en France entre 0,5 et 2% des naissances vivantes. Les infections sont plus rares et plus graves en péri-conceptionnel et au premier trimestre de grossesse. Certains auteurs retrouvent respectivement des pourcentages de transmission de 26%, 28% et 65% au premier, second et troisième trimestre de grossesse. En effet au premier trimestre l'embryon est en plein développement, la placentation est en cours et n'importe quel évènement peut activer la loi du « tout ou rien » et induire une fausse couche ou bien des lésions importantes. Au troisième trimestre de grossesse, les infections sont plus fréquentes, mais également moins pourvoyeuses d'atteintes péjoratives dans la mesure où l'organogénèse est plus avancée. Après une primo-infection au premier trimestre, entre 40% et 50% des nouveau-nés développeront des séquelles neurosensorielles (Figure 11) (Leruez-Ville et al., 2020).



Figure 11 : Histoire naturelle de la primo-infection en cours de grossesse d'après (Leruez-Ville et al., 2020)

En cas de primo-infection maternelle, le taux de transmission du hCMV au fœtus est estimé entre 30 et 40% au premier trimestre de grossesse (Cannon, 2009). Une étude récente réalisée à Necker, Paris, a montré que les infections congénitales par le hCMV étaient dues pour 50% à une primo-infection et pour 50% à des réactivations ou des réinfections (Leruez-Ville et al., 2020).

Contrairement à certains paradigmes antérieurs, Britt a réalisé en 2015 une revue de la littérature qui a montré que l'immunité anti hCMV antérieure à la grossesse, c'est-à-dire une infection hCMV ancienne, pourrait apporter une protection qui ne serait que très partielle chez la descendance et que cette protection serait notamment très limitée en ce qui concerne la transmission intra-utérine (Figure 12). Il parle donc de paradoxe apparent entre immunité ancienne à hCMV et infection congénitale, en effet l'état d'immunosuppression relative de la grossesse peut induire une réactivation virale qui peut elle-même induire une infection congénitale (Britt, 2015).



Figure 12 : Histoire naturelle de l'infection, primo-infection et infection non primaire, en cours de grossesse d'après (Britt, 2015)

Concernant la transmission virale de la mère à l'embryon ou au fœtus, la souche virale retrouvée chez le fœtus est la même que celle présente chez sa mère. Il a été décrit des infections « mixtes » avec plusieurs souches virales impliquées, mais sans lien particulier avec une physiopathologie modifiée (Arav-Boger, 2015). De plus la souche virale impliquée au cours de l'infection est le plus souvent retrouvée au sein de toute la famille (au sens de communauté de vie). Gabrielli *et al.* ont montré que la charge virale présente dans les différents tissus fœtaux était positivement corrélée aux dommages cérébraux et aux défauts de fonctionnement placentaire (Gabrielli et al., 2012).

Les lésions de l'infection congénitale par le hCMV se présentent le plus souvent de manière variable avec des atteintes fréquentes au niveau placentaire et au niveau cérébral, ainsi que des atteintes systémiques. Les atteintes fœtales les plus critiques sont retrouvées en cas d'infection en période péri-conceptionelle ou au cours du premier trimestre de grossesse.

Nous détaillerons dans un premier temps la physiologie placentaire. Ceci nous permettra notamment de décrire les modèles de placentas de premier trimestre utilisés au cours de ce travail de recherche. Dans un deuxième temps, nous nous intéresserons particulièrement aux lésions cérébrales de l'infection congénitale à hCMV.

1.3.3. Physiologie placentaire

Le bon fonctionnement placentaire est essentiel pour le maintien d'une grossesse physiologique et des échanges harmonieux entre la mère et l'embryon. Le placenta est un organe transitoire, qui va évoluer tout au long de la grossesse en parallèle de l'évolution fœtale, avec une durée de vie optimale équivalente à celle de la grossesse : 9 mois.

1.3.3.1. Origine embryonnaire et modèles placentaires

Le placenta fait partie des annexes fœtales, il possède le même matériel génétique que l'embryon (semi allogreffe temporaire pour la mère). Nous allons détailler rapidement le développement du placenta précoce afin d'y positionner les deux modèles de placenta utilisés dans ce travail de thèse.

Au stade blastocyste de l'embryon, la phase la plus précoce de l'implantation débute avec l'accolement dirigé du blastocyste sur l'endomètre. A partir du 6ème jour de développement débute la nidation, c'est-à-dire la pénétration active et totale de l'œuf dans la muqueuse utérine. C'est au cours de cette phase de nidation que débute la différenciation de certaines annexes embryonnaires et notamment le placenta précoce. On observe la différenciation d'une partie du trophoblaste en syncytiotrophoblaste qui envahit la muqueuse utérine, le reste du trophoblaste devient alors le cytotrophoblaste et sépare la masse embryonnaire du syncytio-trophoblaste. Le syncytio-trophoblaste lyse l'endomètre et entraîne avec lui l'œuf jusqu'à son inclusion entière dans la muqueuse utérine en se creusant également de lacunes permettant une irrigation par le sang maternel. En suivant le stade lacunaire, les villosités primaires vont se mettre en place via la prolifération des cytotrophoblastes. Le mésoblaste extra-embryonnaire va les creuser pour former les villosités secondaires et enfin après mise en place de la vascularisation les villosités trophoblastiques tertiaires seront formées (3^{ème} semaine). Les villosités tertiaires vont se multiplier et se développer jusqu'à la fin du troisième mois de grossesse, augmentant ainsi la surface d'échange entre les versants maternel et embryonnaire (Handschuh et al., 2007; Staun-Ram & Shalev, 2005).

L'invasion trophoblastique et le bon fonctionnement placentaire sont donc essentiels pour une grossesse physiologique, tout défaut d'implantation et/ou d'invasion pouvant conduire à des fausses-couches ou à des pathologies gravidiques. Par exemple, la physiopathologie de la pré-éclampsie, longtemps considérée comme une pathologie hypertensive de fin de grossesse, prend en réalité ses sources dans un défaut d'invasion trophoblastique très précoce (O'Tierney-Ginn & Lash, 2014). Les points d'interactions entre le versant maternel et fœtal sont variés : trophoblaste, synciotio-trophoblaste, chorion (Figure 13). Des défauts dans les échange au niveau de chacun de ces points de communication peuvent avoir des effets délétères sur le développement placentaire ou fœtal.



Figure 13 : Les cinq points d'interaction de l'interface fœto-placentaire 1/ trophoblaste extravilleux au contact des cellules déciduales 2/ trophoblaste endovasculaire et interstitiel envahissant et remplaçant les parois des artères utérines 3/ syncytio-trophoblaste villositaire au contact du sang maternel dans la chambre intervilleuse 4/ chorion tapissant la chambre intervilleuse 5/ passage des cellules trophoblastiques dans la circulation maternelle (Mesdag et al., 2014).

Pavan *et al.* ont développé, à partir de cellules cytotrophoblastiques extra-villeuses invasives issues de placenta de premier trimestre, la lignée HIPEC (Human Invasive
Proliferative Extravillous Cytotrophoblast), qui est le modèle cellulaire placentaire utilisé au cours de ce travail de thèse (Pavan et al., 2003).

Afin d'étudier plus finement les mécanismes impliqués dans la physiopathologie du placenta précoce, Lopez *et al.* ont mis au point au sein du laboratoire une technique de culture *ex-vivo* d'explants trophoblastiques de placentas de premier trimestre issus d'IVG à l'interface air/liquide (Lopez et al., 2011). Cette méthode permet de conserver d'une part l'architecture des villosités (Figure 14), et d'autre part de maintenir en culture les différents types cellulaires impliqués dans le fonctionnement naturel du tissu (cytotrophoblastes, mais aussi cellules mésenchymateuses) et donc d'analyser des effets biologiques sur la structure tissulaire complète. Ce modèle tissulaire a été utilisé également au cours de ce travail de thèse, en complément du modèle cellulaire HIPEC.



Figure 14 : Immunohistochimie sur explants de trophoblaste issus de placenta de premier trimestre A/ Cytokératine 7 (cytotrophoblaste) B/Phosphatase alcaline placentaire (cytotrophoblaste) C/ Vimentine (cellules mésenchymateuses) (Bergamelli et al., 2021).

1.3.3.2. Fonctions physiologiques du placenta

Le placenta exerce des rôles multiples envers le fœtus : transfert des nutriments, traitement des déchets, sécrétion d'hormones et de nombreux facteurs impliqués dans le bon équilibre du développement fœtal.

Le placenta a longtemps été considéré comme une barrière entre la mère et le fœtus : il s'agit en réalité plutôt d'une non-barrière placentaire. La diffusion passive au sein de la « barrière » placentaire favorise les molécules de poids moléculaire <500 Da. Concernant le transport actif, le placenta exprime de nombreux transporteurs permettant de transférer vers le fœtus des molécules essentielles (folates) ou au contraire de favoriser l'efflux de certaines molécules. Le placenta permet le passage des IgG vers le compartiment fœtal, mais pas des

autres immunoglobulines, permettant ainsi la transmission d'une protection immunitaire relative au fœtus. En plus de ce rôle de transfert de nutriments et de traitement des déchets fœtaux, le placenta possède également un rôle sécréteur. Les hormones sécrétées par le placenta sont finement régulées au cours de la grossesse et leurs taux variables répondent aux besoins spécifiques de chaque trimestre, notamment l'hormone gonadotrophine chorionique humaine qui induit au premier trimestre le maintien de la sécrétion progestative du corps jaune.

Nous développerons par la suite les effets de l'infection hCMV sur le placenta précoce.

1.3.4. Atteintes placentaires liées à l'infection congénitale par le Cytomégalovirus

Au cours d'une virémie maternelle, le hCMV peut infecter le placenta et y induire d'une part des modifications de fonctionnement induisant un panel de lésions variables, et d'autre part y installer de véritables usines de réplication virale productives. Cette réplication virale active conduit l'embryon ou le fœtus à être au contact avec le virus sur de longues périodes, et pas seulement sur une phase aigüe (Fisher et al., 2000).

niveau Au clinique, les atteintes placentaires visibles en échographie sont principalement la placentomégalie et les calcifications placentaires. Le signe d'appel échographique le plus fréquemment retrouvé pour l'infection congénitale à hCMV est le retard de croissance intra-utérin. Ce RCIU peut être lié à la fois à l'infection directe de l'embryon ou du fœtus mais également aux défauts de vascularisation eux même liés à des défauts d'invasion trophoblastique optimale (Leruez-Ville et al., 2020). En 2019, Uenaka et al. ont analysé les caractères histologiques de 35 placentas de cas cliniques ayant présenté une infection congénitale à hCMV : ils ont retrouvé la présence de protéines virales de hCMV dans 30 de ces placentas et ont décrit que le nombre de cellules infectées était inversement proportionnel à l'âge gestationnel à l'accouchement. Les modifications de l'architecture des villosités et les scores d'inflammation chronique des villosités placentaires étaient par ailleurs significativement plus importants chez les patientes présentant une primo-infection que chez celles avec une réactivation virale (Uenaka et al., 2019).

Au niveau moléculaire, certains mécanismes *via* lesquels le hCMV perturbe le fonctionnement placentaire sont décrits, mais la vue d'ensemble permettant d'expliquer la variabilité des lésions retrouvées reste, elle, incomplète (Njue et al., 2021). Il a notamment été montré que l'infection de cytotrophoblastes, issus de placentas précoces, par le hCMV induit

un défaut de migration et d'invasion des cytotrophoblastes *via* plusieurs mécanismes dont l'activation du facteur PPAR γ et la diminution de l'expression de l'intégrine $\alpha 1\beta 1$ (Fisher et al., 2000; Pereira et al., 2007; Rauwel et al., 2010). De plus, le hCMV limite la différenciation des progéniteurs trophoblastiques (Tabata et al., 2015). L'apoptose médiée par le TNF α est augmentée dans les trophoblastes suite à l'infection par le hCMV (G. Chan et al., 2002). L'infection par le hCMV induit également une inhibition de l'activité de l'indoleamine 2,3dioxygénase, conduisant à des dysfonctionnements placentaires précoces (Lopez et al., 2011). Ces mécanismes impliqués dans le processus d'infection du placenta par le hCMV sont représentés schématiquement dans la figure 15.



Figure 15 : Anatomie de l'interface materno-foetale et mise en évidence des mécanismes potentiels impliqués dans les atteintes de l'infection congénitale par le hCMV. 1/ Dysfonctionnement de la fonction et de la différenciation des progéniteurs trophoblastiques 2/ Limitation du potentiel d'invasion des trophoblastes extra-villeux 3/ Dérégulation de la voie de signalisation Wingless dans les cytotrophoblastes 4 /Augmentation de l'apoptose médiée par le TNFα dans les trophoblastes 5/Modification de profil cytokinique placentaire 6/ Inhibition de l'activité indoleamine 2,3-dioxygénase 7/ Baisse de l'expression trophoblastique des CMH1 Abréviations :CMV = Cytomégalovirus; EVT = trophoblaste extra villeux; HLA = Antigène Leucocyte

humain; IDO = indoleamine 2,3-dioxygenase; IL-10 = interleukin-10; MCP = protéine chemoattractante monocytaire; MHC = complexe majeur d'histocompatibilité; ROR2 = récepteur 2 aux tyrosine kinase-like; TBPC = cellules souches progénitrice de trophoblastes; Wnt = Wingless. Les flèches oranges vers le haut indiquent une surexpression et vers le bas une sous expression. D'après (Njue et al., 2021).

En résumé, l'infection précoce du placenta par le hCMV exerce des effets sur le processus physiologique d'invasion trophoblastique, sur le métabolisme placentaire et induit des défauts dans l'équilibre d'échanges materno-fœtaux.

1.3.5. Atteintes cérébrales liées à l'infection congénitale par le Cytomégalovirus

De la même manière que pour les atteintes placentaires, les lésions retrouvées au niveau cérébral chez les embryons ou les fœtus infectés en cours de grossesse par le hCMV sont très variables. On peut les diviser en plusieurs catégories en fonction de leur gravité, de leur type (malformations ou défauts neurosensoriels) ou de leur temporalité d'apparition.

L'infection congénitale par le hCMV cause le plus souvent des lésions de type neurosensorielles, avec des surdités et/ou cécité uni ou bilatérales. Ces lésions apparaissent généralement en dehors de la période périnatale et sont diagnostiquées tardivement au cours des premières années de vie de l'enfant. Lors du développement de la parole un appareillage auditif précoce peut permettre aux jeunes enfants de limiter le développement de handicaps trop sévères. Les retards ou défauts diagnostics peuvent donc être extrêmement délétères pour l'acquisition du langage et des capacités d'interactions sociales. L'infection congénitale par le hCMV peut également induire de l'épilepsie, principalement chez les nouveau-nés symptomatiques à la naissance. On retrouve fréquemment en cas d'infection en cours de grossesse des retards comportementaux et de développement (Leruez-Ville et al., 2020).

Il n'existe pas à ce jour de moyen pronostic permettant de prévoir ces atteintes et la prise en charge passe essentiellement par de la prévention et le suivi des jeunes enfants dont on connait le statut hCMV à la naissance. C'est d'ailleurs pour la population de nouveau-nés non symptomatiques à la naissance que le risque de défaut de diagnostic est le plus important (Cannon, 2009). Sur 1000 naissances, le nombre d'enfants présentant des séquelles permanentes sera plus élevé dans la catégorie des nouveau-nés asymptomatiques par comparaison avec celle des nouveau-nés symptomatiques (Figure 16 : case grisée « *118 permanent disabilities* »). C'est précisément cette population qui est à risque de défaut de diagnostic et de retard de prise en charge (Figure 16).



Figure 16 : Arbre récapitulatif de la fréquence des lésions retrouvées dans la population générale des nouveau-nés infectés par le hCMV, symptomatiques ou non à la naissance, sur un panel d'enfants aux Etats-Unis. D'après (Cannon, 2009).

Le suivi échographique et IRM si nécessaire permettent de mettre en évidence un certain nombre de lésions macroscopiques fréquemment retrouvées en cas d'infection congénitale à hCMV : microcéphalie, ventriculomégalie et hydrocéphalie. Des lésions plus rares peuvent également être retrouvées comme des agénésies du corps calleux, des lissencéphalies, des schizencéphalie etc.... (Leruez-Ville et al., 2020). Ces atteintes cérébrales peuvent être très délétères voire non viables (Figure 17). Les atteintes du système nerveux central visibles en imagerie sont globalement de mauvais pronostic, notamment si elles apparaissent au premier trimestre de grossesse (Cheeran et al., 2009).



Figure 17 : Atteintes cérébrales sévères dues à une infection congénitale à hCMV. A/ Calcifications périventriculaires et dilatation ventriculaire B/ Polymicrogyrie (défaut de migration neuronale) C/ schizencéphalie(A=Tomographie, B et C = IRM) D'après (Cheeran et al., 2009).

En résumé concernant les lésions cérébrales induites par le hCMV, on retrouve des défauts cognitifs, des défauts de communication neuronale et des atteintes neurosensorielles, dont le diagnostic et la prise en charge restent complexes, notamment de par la très grande variabilité des lésions.

Au niveau physiopathologique, l'infection par le hCMV induit des défauts de prolifération, de migration et de différenciation des cellules souches neurales dont les fonctions sont essentielles au bon développement cérébral précoce. L'infection par le hCMV peut également induire des altérations dans la mise en place des différentes couches corticales (Figure 18). Les effets sur le développement cérébral sont donc dévastateurs, car tous les futurs types cellulaires cérébraux résidants (neurones, astrocytes et oligodendrocytes), leur positionnement, ainsi que leur communication vont être perturbés.



Figure 18 : Schéma d'une coupe d'un hémisphère cérébral précoce mettant en évidence certains mécanismes neuro-pathogéniques retrouvés au cours de l'infection congénitale par le hCMV et induisant des défauts dans le développement de nouveaux circuits cérébraux. 1/ Limitation du potentiel d'auto-renouvellement des cellules souches neurales 2/ Impact délétère sur la capacité de différenciation des cellules souches neurales 3/ Défaut de migration des neuroblastes (retrouvé aussi chez les cellules souches neurales mais non décrit sur ce schéma) 4/ Impact sur la formation physiologique des différentes couches neuronales du neocortex 5/ Défaut d'adressage des couches neuronales par les cellules gliales 6/ Sécrétion de médiateurs inflammatoires (cytokines, radicaux libres) pouvant affecter le bon développement neuronal via des effets cytotoxiques ou des modifications de voies de signalisation. D'après (Cheeran et al., 2009).

Plus précisément au niveau moléculaire, le hCMV induit notamment une augmentation de l'expression de PPARγ ce qui induit un défaut de neuronogenèse au cours de la différenciation des cellule souches neurales en neurones (Rolland et al., 2016). De manière intéressante, le hCMV augmente également l'expression de la protéine LIS1 au sein des cellules souches neurales, induisant des défauts dans leur potentiel de migration (Rolland et al., 2021). Cette surexpression de LIS1 avait été préalablement décrite dans des cas génétiques de

lissencéphalie (une pathologie congénitale où les nombreux défauts de migration neurale vont induire des cerveaux sans gyrations d'apparence lisse). On retrouve dans certaines cas sévères d'infections congénitales à hCMV ces atteintes cérébrales « lissencéphalie like », où les fœtus peuvent présenter des cerveaux sans gyrations.

Les cellules souches neurales humaines sont donc un modèle de choix pour étudier l'effet de l'infection par le hCMV sur les étapes précoces du développement cérébral (réplication, différenciation et migration). En effet, on peut induire spécifiquement la différenciation de ces cellules souches neurales en neurones, et donc quantifier l'impact de facteurs exogènes sur leur capacité de différenciation. La figure 19 illustre cette différenciation, avec un changement depuis des marqueurs cellulaires souches vers des marqueurs neuronaux au cours d'une expérience de différenciation des cellules souches neurales en neurones.



Figure 19 : Caractérisation en immunofluorescence de cellules souches neurales humaines en conditions prolifératives (maintien du caractère souche) à gauche ou en conditions de différenciation (8jours) à droite. Marquage nucléaire (DAPI), marquage de cytosquelette non différencié (nestine), marquage nucléaire non différencié (SOX2), marquage de cytosquelette neuronal (β3Tubuline) et marquage nucléaire neuronal (HUC/D) D'après (Rolland et al., 2016).

1.3.6. Autres atteintes liées à l'infection congénitale par le Cytomégalovirus

En addition des atteintes placentaires et cérébrales, le hCMV peut induire un panel très large de symptômes extra-cérébraux chez le fœtus. Il s'agit de lésions viscérales souvent non spécifiques (intestin hyperéchogène et calcifications intestinales, hépatosplénomégalie), d'atteintes oculaires (choriorétinite) et de modification de la formule sanguine fœtale (thrombopénie) (Cannon et al., 2014; Leruez-Ville et al., 2020).

1.3.7. Prise en charge médicale de l'infection congénitale par le Cytomégalovirus

1.3.7.1. Diagnostic, pronostic et suivi

Le diagnostic de l'infection congénitale à hCMV n'est systématique dans aucun pays. En France, deux cas de figure se présentent : recherche de séroconversion en cas de signes d'appel échographiques au cours d'un suivi de grossesse classique ou si la patiente enceinte est à risque particulier de contact avec le virus. En première intention, la sérologie maternelle, avec recherche des IgG et des IgM permet de connaître le statut quant à une infection ancienne. En cas de doute, une mesure d'avidité peut aider à déterminer si la séroconversion a eu lieu en période péri-conceptionelle ou à distance de la grossesse (Figure 20).



Figure 20 : Profil d'évolution des IgG, IgM et de l'avidité des IgG suite à une infection. Le niveau d'IgG, d'IgM et l'avidité mesurés permettent d'estimer a posteriori la période au cours de laquelle a eu lieu la séroconversion.

En fonction des signes échographiques et des résultats sérologiques, le diagnostic de référence pour évaluer la transmission maternofœtale consiste à réaliser une PCR hCMV (UL83) sur du liquide amniotique. Le geste de l'amniocentèse, bien que maîtrisé, reste invasif et la réalisation de l'amniocentèse ne peut être faite qu'après 21 semaines d'aménorrhées (reins fœtaux fonctionnels) et 6 semaines après la primo-infection (Leruez-Ville et al., 2020).

Une fois les données sérologiques, virologiques et cliniques connues, plusieurs possibilités sont envisagées par le corps soignant et les parents. A titre d'exemple, les femmes présentant une séroconversion sans lésions fœtales associées et avec PCR amniotique négative vont être suivies plus fréquemment avec des échographies supplémentaires mais les soignants vont être assez rassurants quant au devenir de l'enfant car le risque de lésions tardives est quasi nul. En France, si un fœtus présente des lésions graves voire létales, notamment cérébrales, l'équipe médicale peut proposer en accord avec le CPDPN et les parents une interruption médicale de grossesse. Entre ces deux cas extrêmes, il existe un vaste panel de situations cliniques très variables, et pour lesquelles les moyens pronostics font cruellement défaut. Les critères de gravité sont connus : infection à un faible âge gestationnel, lésions associées... mais l'établissement d'un pronostic reste complexe. Une équipe a récemment proposé un processus pronostic consistant à combiner plusieurs données cliniques et biologiques : données échographiques et compte plaquettaire fœtal (Benoist et al., 2008). Cette méthode est donc invasive car elle requiert une ponction de sang fœtal (cordocentèse) en plus de l'amniocentèse.

Le suivi de ces couples mères-enfants ne s'arrête pas le jour de l'accouchement. En cas de naissance vivante, une recherche de hCMV par PCR sera réalisée sur salive et/ou urines néonatales afin de valider ou non l'infection du fœtus. En addition, ces nouveau-nés seront suivis par les équipes pédiatriques durant leurs premières années de vie afin d'évaluer leur bon développement ainsi que l'apparition potentielle de lésions neurosensorielles. La figure 21 présente une proposition de protocole de prise en charge des infections congénitales à hCMV (suivi biologique et imagerie, potentiel traitement).



Figure 21 : Algorithme proposé pour la prise en charge de l'infection congénitale par le hCMV (Leruez-Ville et al., 2020).

En résumé, la prise en charge médicale des infections congénitales à hCMV est complexe. Chaque dyade mère-fœtus peut présenter des variabilités biologiques et cliniques qui rendent difficile la mise en place d'un protocole de soin applicable à tous. Les parents comme les équipes médicales peuvent se sentir démunis face au manque de moyens pronostics existants, notamment concernant les lésions neurosensorielles. De plus il n'existe actuellement pas de consensus médical ni scientifique concernant les traitements de ces infections congénitales.

1.3.7.2. Traitements

Prévention et éducation thérapeutique

Les patientes à risque de séroconversion hCMV en cours de grossesse sont majoritairement des femmes, au contact de fluides biologiques de jeunes enfants (travail en crèche, assistance maternelle ou aines à la maison) ou de personnes âgées immunodéprimées (assistante de vie, aides-soignantes). La possibilité de réaliser de l'éducation thérapeutique *via* une information de prévention concernant l'infection congénitale est perçue positivement par les femmes en âge de procréer (Cannon, 2009). De plus, la mise en place de cette prévention concernant le risque d'infection congénitale à hCMV et une information sur les mesures d'hygiène et de prévention nécessaires chez des patientes séronégatives diminue significativement le taux de séroconversion en cours de grossesse (Vauloup-Fellous et al., 2009). Comme de nombreuses interventions d'éducation thérapeutique, cette information de prévention n'est toutefois pas mise en place systématiquement en France en début de grossesse et de nombreuses femmes en âge de procréer et travaillant dans des domaines à risque de séroconversion hCMV n'ont pas connaissance des mesures de protection à mettre en place.

Traitements médicamenteux de l'infection congénitale à hCMV

Il n'existe pas actuellement de consensus médical concernant le traitement de l'infection congénitale par le hCMV. Le valaciclovir, prodrogue de l'aciclovir, est un inhibiteur de l'ADNpolymérase avec peu d'effets secondaires notamment une toxicité rénale limitée. L'équipe de Leruez-Ville a montré en 2016 qu'un traitement à fortes doses de valaciclovir en cours de grossesse améliorait le devenir des fœtus modérément infectés par le hCMV (Leruez-Ville et al., 2016). Ce traitement potentiel est proposé dans le protocole de prise en charge des infections congénitales présenté en figure 21. Une étude clinique récente, en double aveugle avec groupe placebo a montré qu'un traitement par valaciclovir donné entre la séroconversion et la date prévue d'amniocentèse, semblait efficace pour réduire le taux d'infection verticale fœtale à hCMV du premier trimestre de grossesse (Shahar-Nissan et al., 2020). Il serait nécessaire de réaliser cette étude sur un plus grand panel de patientes présentant une séroconversion hCMV en cours de grossesse afin de déterminer notamment les posologies les plus adaptées.

Vaccin contre le hCMV

A ce jour, il n'existe pas de vaccin validé contre le hCMV, mais le développement d'un vaccin permettant de prévenir les infections, notamment chez les jeunes femmes avant leur grossesse a été défini comme une priorité de santé publique pour le siècle à venir par les agences internationales de santé publique. Plusieurs candidats vaccins ont été développé contre le hCMV et certains sont actuellement en phase clinique avec des résultats encourageants en termes d'immunogénicité et de tolérance (Figure 22).

Antigen	Format	Company	Clinicaltrials.gov number	Publications
gB/eVLP	Virus-like particle	Variation Biotechnology	NCT02826798	Kirchmeier et al, 2014 ¹⁸⁹
Virion	Live virus, replication defective	Merck	NCT01986010 NCT03486834 NCT03840174	Adler et al, 2019 ¹⁹¹ Wang et al, 2016 ¹⁹⁰
gB/pentameric complex	mRNA/lipid nanoparticle	ModernaTX	NCT03382405	John et al, 2018 ¹⁹²

Figure 22 : candidats vaccins contre le hCMV en cours d'études cliniques (Leruez-Ville et al., 2020).

En cas de vaccin approuvé et efficace se posera la question du calendrier vaccinal à mettre en place : à l'adolescence comme pour le vaccin contre le papillomavirus ? A la consultation pré-conceptionelle ?

Dans cette première partie, nous avons suivi les différentes étapes clés de l'infection congénitale à hCMV. Comme décrit au cours de cette présentation, les mécanismes permettant d'expliquer les lésions liées à l'infection congénitale par le hCMV ainsi que leur variabilité restent méconnus. Dans ce contexte, nous nous sommes intéressés aux vésicules extracellulaires placentaires en tant que médiateurs biologiques de communication entre la mère et le fœtus. Dans le deuxième axe de cette introduction, nous allons nous focaliser sur les vésicules extracellulaires, en conditions physiologiques, en cours de grossesse ou encore au cours d'infections virales.

2. Les vésicules extracellulaires

2.1. Généralités sur les vésicules extracellulaires

2.1.1. Historique de la découverte des vésicules extracellulaires

En 1983, Harding *et al.* s'intéressent au transfert du fer au sein des réticulocytes. Ils décrivent en microscopie électronique des vacuoles contenant des vésicules, avec des molécules de transferrine marquées préalablement à l'or, présentes sous la couche interne de la membrane plasmique. Ils nomment ces compartiments : endosomes multi-vésiculaires (Figure 23) (C. Harding et al., 1983).



Figure 23 : Exocytose de vésicules contenues dans les endosomes multi-vésiculaires. 12/ Endosome multi-vésiculaire proche de la membrane plasmique Barre = 100 nm 13/ Exocytose du contenu d'un endosome multi-vésiculaire réticulocytaire marqué avec de la transferrine couplée à des billes d'or Barre = 200nm (C. Harding et al., 1983).

Au-delà d'une meilleure connaissance d'un des mécanismes impliqués dans la régulation de la voie de la transferrine, cette découverte a permis d'aller plus loin que le modèle réticulocyte/transferrine en appliquant cette nouvelle description à d'autres thématiques de recherche. En 1996, Raposo *et al.* ont décrit dans des lymphocytes B un système similaire de fusion de compartiment contenant des vésicules à la membrane plasmique et relargage dans le milieux extracellulaire. En plus de cette description, les auteurs ont montré un effet biologique immunitaire dû à ces vésicules sécrétées par les Lymphocytes B (présentation antigénique conduisant à une activation des T). Ils nomment ces vésicules exosomes (Figure 24) (Raposo et al., 1996).



Figure 24 : Image en microscopie électronique du culot de surnageant de culture des lymphocytes B centrifugé à 70000g, avec un immuno-marquage pour le CMH de type II. Barre = 200nm (Raposo et al., 1996).

A partir de cette découverte non plus seulement descriptive mais liant les vésicules avec un effet biologique, la recherche dans le domaine des "exosomes" explose, tant sur le nombre de publications que sur les thématiques de recherche concernées. De nombreuses équipes s'intéressent à l'impact de ces exosomes sur la communication intercellulaire, en immunologie, en oncologie, dans des contextes infectieux... (C. V. Harding et al., 2013; Théry et al., 2002).

Un point essentiel a consisté en la découverte du contenu en ARN messager et en miARN des exosomes, et du caractère transmissible de ces ARN (Valadi et al., 2007). De même, la preuve que le contenu exosomal n'était pas dû au hasard, mais qu'il existait réellement un enrichissement spécifique en certaines molécules a validé l'intérêt de la recherche sur les exosomes en physiopathologie. Depuis, la recherche sur les vésicules extracellulaires a connu un développement très important, nécessitant d'encadrer les bonnes pratiques d'étude et de s'accorder sur une nomenclature commune au niveau mondial (Théry et al., 2018).

Notre intérêt se portant spécifiquement sur les vésicules extracellulaires placentaires, il convient de noter une incursion descriptive de la médecine dans ce domaine, bien avant la découverte « officielle » des vésicules extracellulaires. En 1893, G. Schmorl décrit dans des poumons de patientes enceintes décédées d'éclampsie des sortes de fragments syncitiaux, de regroupements circulaires de cellules de type fœtal ou placentaire qui auraient donc circulé depuis l'utérus jusque dans les poumons (Sadovsky et al., 2020). Cette observation a été la première base de travail pour explorer l'hypothèse selon laquelle des « médiateurs » placentaires ou des « fragments » originaires du placenta pourraient jouer un rôle dans certaines pathologies gravidiques. La première description "moderne" de vésicules extracellulaires

placentaires concerne la tolérance immunitaire maternelle placentaire *via* ces vésicules, chez des patientes présentant une pré-éclampsie (Frängsmyr et al., 2005).

2.1.2. Types de vésicules extracellulaires et sémantique

2.1.2.1. Sémantique

Les vésicules extracellulaires se classent en différentes catégories selon leurs caractéristiques, notamment de taille, de biogénèse, de composition et de fonction. Aujourd'hui, malgré des progrès technologiques importants dans l'étude des EV, il n'existe pas de marqueur canonique d'un type d'EV particulier. Dans ce contexte il est impossible, voire faux, de parler d'exosomes, sans avoir réalisé une description exhaustive à la fois de la biogénèse, de la composition et des caractéristiques biophysiques de la population de vésicules étudiées. En termes de littérature, de nombreuses études ont été réalisées antérieurement aux recommandations internationales de nomenclature et une précision particulière doit être apportée à la sémantique lors de l'analyse de ces données scientifiques.

Dans notre travail de recherche, conformément aux recommandations émises par la société internationale des vésicules extracellulaires (ISEV, société scientifique spécialisée sur le domaine des EV), nous utiliserons les termes génériques de vésicules extracellulaires et de petites ou grandes vésicules extracellulaires pour préciser les populations étudiées (Théry et al., 2018). Afin de conserver une cohérence dans notre introduction, les données de la littérature produites seront également décrites suivant ces termes lorsque cela est possible, et non pas avec ceux utilisés dans les publications originales (remplacement du terme exosome par sEV quand le caractère exosomal n'a pas été défini par exemple).

2.1.2.2. Populations de vésicules extracellulaires

Les populations de vésicules extracellulaires produites par un type cellulaire donné sont très hétérogènes (Figure 25). On les différencie de manière théorique par leur voie de biogénèse, leur taille, leur composition et leurs fonctions. Il existe selon la classification actuellement en vigueur, les vésicules extracellulaires de petite taille (exomères et exosomes) et celles de grandes tailles (microvésicules, ectosomes, oncosomes et corps apoptotiques).



Figure 25 : Représentation schématique d'une cellule sécrétant des populations hétérogènes de vésicules extracellulaires, différenciées par leur voie de biogénèse et leur taille (Marostica et al., 2021).

Exomères

La découverte très récente des exomères a été rendue possible par des progrès techniques, notamment physiques permettant de séparer les populations de petites vésicules extracellulaires de manière plus précise (H. Zhang et al., 2018). Les exomères constituent une population de nanovésicules, présentant une taille moyenne de 35 nm et dont les processus de biogénèse ne sont pas connus (Zijlstra & Di Vizio, 2018). Comme les autres types de vésicules extracellulaires, les exomères contiennent des protéines, lipides et ARN non codant pouvant exercer une variété de fonctions biologiques. Bien que leurs impacts biologiques ne soient pas en totalité compris, on sait notamment que leur cargo protéique peut être transmis à une cellule réceptrice (Q. Zhang et al., 2019).

Exosomes

Les exosomes sont des nano-vésicules membranaires avec une taille allant de 50 à 150 nm de diamètre, ils sont originaires de la voie endosomale. Tous les types cellulaires sécrètent

des exosomes (Kalluri & LeBleu, 2020). On peut plus spécifiquement détailler deux populations, celle des "large exosome" 90-120 nm et des "small exosome" 60-80 nm, mais cette distinction est rarement faite dans l'étude des effets biologiques des exosomes (Mathieu et al., 2021; H. Zhang et al., 2018). Les exosomes sont chargés de manière spécifique avec leur cargo protéique, lipidique et génétique, il existe notamment un enrichissement spécifique en certaines protéines de surface ou intra-vésiculaires. Les exosomes permettent une communication locale ou à distance au sein de l'organisme, et la délivrance de leur cargo aux cellules cibles impacte de nombreux mécanismes physiopathologiques (oncogenèse, neuro-inflammation, modulation de certaines pathologies infectieuses...). En sus de ces effets biologiques, ce sont des candidats de choix pour le développement de biomarqueurs de suivi et/ou de prévention de certaines pathologies car ils se retrouvent dans tous les fluides biologiques (Doyle & Wang, 2019).

Microvésicules

A la différence des exosomes, les microvésicules se forment par bourgeonnement de la membrane plasmique. Leur taille peut varier entre 150 nm et 1µm de diamètre. De manière similaire aux exosomes, les microvésicules présentent une composition dépendante de la cellule d'origine, de son état d'activité physiologique et de la présence d'un état pathologique. Ce ne sont pas des vésicules inertes servant à décharger la cellule de ses déchets, leur cargo, chargé dans la vésicule de manière active, est transmis à des cellules cibles et y induit des effets biologiques. Les microvésicules présentent donc des caractéristiques, en termes d'effet biologique et de potentiel biomédical, assez similaires à celles des exosomes (Doyle & Wang, 2019).

Corps apoptotiques

Les corps apoptotiques sont relargués dans le milieu extracellulaire par les cellules en apoptose. Ces vésicules présentent un diamètre très variable, allant de 500nm à 5µm. A la différence des exosomes et des microvésicules, le contenu des corps apoptotiques reflète celui du cytoplasme cellulaire, avec notamment la présence d'organelles entières. L'analyse protéomique des corps apoptotiques est similaire à celle obtenue après un lysat cellulaire, il ne semble donc pas y avoir, à la différence des autres types d'EV, de voie spécifique conduisant à une charge sélective de matériel cellulaire dans ce type vésiculaire (Doyle & Wang, 2019).

Dans notre étude, nous nous sommes particulièrement intéressées aux vésicules extracellulaires de petite taille d'origine trophoblastique et placentaire, dont nous avons montré qu'elles présentaient des caractères de type exosomal (taille, marqueurs et composition). Par la suite nous détaillerons spécifiquement la biogénèse, la structure et les fonctions des petites vésicules extracellulaires de type exosomal.

2.1.3. Biogénèse et sécrétion des petites vésicules extracellulaires

2.1.3.1. Biogénèse

Schématiquement, la biogénèse endosomale des sEV se fait par invagination de la membrane au sein des endosomes tardifs. Les endosomes tardifs contenant les vésicules évoluent en corps multi-vésiculaires (MVB). Ces MVB peuvent alors fusionner avec la membrane plasmique, libérant ainsi les sEV dans le milieu extracellulaire (Figure 26).



Figure 26 : Différentes étapes de la biogénèse des sEV de type exosome et organites cellulaires impliqués. D'après (Kalluri & LeBleu, 2020).

Plus précisément, la biogénèse des exosomes comporte des étapes successives impliquant de nombreuses organelles. Tout d'abord, les composants extracellulaires (protéines, lipides, métabolites...) pénètrent dans la cellule *via* une invagination de la membrane plasmique (Figure 26.1). La partie luminale de cette vacuole d'endocytose correspond à la face extérieure de la membrane cellulaire, avec notamment des protéines membranaires. Ce processus conduit directement à la formation d'endosomes précoces ou bien à la fusion de la vacuole d'endocytose avec des endosomes précoces déjà formés (par le réticulum endoplasmique ou le réseau

transgolgien). Les endosomes précoces contiennent donc des composants variés, intra et extracellulaires. Les endosomes précoces se transforment en endosomes tardifs au sein desquels va se produire un second processus de bourgeonnement, cette fois-ci intraluminal. Au sein des MVB, ces vésicules intraluminales (futures sEV) peuvent subir plusieurs modifications de leur cargo (Figure 26.2). On retrouve à ce stade, sur ou dans les vésicules intraluminales, des protéines cytoplasmiques mais d'autres également originaires de la membrane plasmique. Les corps multivésiculaires peuvent ensuite fusionner avec des autophagosomes et leur contenu sera dégradé au sein des autophagolysosomes, ou bien fusionner directement avec les lysosomes (Figure 26.3). Une autre voie possible consiste en la fusion des corps multivésiculaires avec la membrane plasmique grâce à de protéines d'amarrage ce qui induit le relargage dans le milieu extracellulaire de leur contenu en vésicules (Figure 26.4). L'exocytose des sEV *via* ce mécanisme conduit donc les sEV à présenter les protéines initialement présentes à la surface cellulaire sur leur propre membrane externe (Kalluri & LeBleu, 2020).

De nombreuses protéines sont impliquées dans le processus dynamique de biogénèse des sEV, notamment les GTPases RAB, les protéines ESCRT, certaines protéines de la famille des tétraspanines (CD9, CD63, CD81) et d'autres protéines souvent utilisées comme marqueurs des exosomes (Alix, TSG101, flotilline). Plusieurs complexes ont été décrits comme ayant un rôle dans la maturation endosomale des corps multivésiculaires et donc dans la synthèse des sEV. On retrouve les composants ESCRT, le complexe des tétraspanines et la voie lipidique de la sphingomyélinase/céramide (Figure27). A l'heure actuelle, on ne sait toutefois pas si ces trois complexes agissent de manière simultanée ou indépendante la maturation des corps multivésiculaires (Colombo et al., 2014). L'inactivation de la voie ESCRT n'empêche d'ailleurs pas la formation des corps multivésiculaires (Stuffers et al., 2009).



Figure 27 : Les trois voies principales impliquées dans la biogénèse des sEV au sein des corps multivésiculaires : « ESCRT », « tétraspanines » et « shingomyélinase » (Colombo et al., 2014).

2.1.3.2. Sécrétion

La sécrétion des sEV se fait majoritairement par exocytose des corps multivésiculaires contenant les vésicules directement dans le milieu extracellulaire (Figure 28). La protéine Rab27a/b est impliquée dans cette maturation des corps multivésiculaires. De manière intéressante, Rab27a/b joue également un rôle dans le relargage de certains virions (Mathieu et al., 2019).



Figure 28 : Mécanismes simplifiés de sécrétion des sEV contenues dans les MVB jusqu'au milieu extracellulaire (Mathieu et al., 2019).

2.1.4. Structure et composition des petites vésicules extracellulaires

2.1.4.1. Structure

Les sEV sont des nano-vésicules lipidiques membranaires sphériques, de 50 et 150nm de diamètre (Figure 29). L'analyse de la structure de ces petites vésicules fragiles se fait préférentiellement grâce aux techniques de microscopie électronique (classique ou cryoEM) qui permettent une résolution fine et donc une étude de leur morphologie (Colombo et al., 2014; Raposo et al., 1996).



Figure 29 : sEV de cellules trophoblastiques analysées en microscopie électronique à transmission. On retrouve une pseudo-structure classique liée aux artéfacts de fixation (forme circulaire, avec une double membrane apparente ressemblant à une « tasse ») Barre =100nm (Bergamelli et al., 2020)

En utilisant les techniques de NTA (Nanoparticle Tracking Analysis), on peut également définir la distribution de taille dans la population de vésicules étudiées, en se basant sur leur mouvement Brownien (Figure 30).



Figure 30 : Image d'illustration d'un compte rendu d'analyse NTA : représentation de l'intensité relative des particules en fonction de leur taille (2D à gauche et 3D à droite).

2.1.4.2. Composition

La composition des sEV est très variable, dépendante du type cellulaire d'origine et également de l'état physiologique ou pathologique de la cellule. De plus, les sEV issues d'un même type cellulaire peuvent être hétérogènes en terme de composition. C'est pourquoi, pour être plus précis, il convient de parler de population d'EV. L'analyse de certains marqueurs canoniques liés à la biogénèse endosomale permet par exemple de décrire une population d'EV comme étant une population d'exosomes (Jeppesen et al., 2019; Mathieu et al., 2021). On retrouve dans les sEV différentes familles de molécules : protéines, lipides, acides nucléiques.

Des outils collaboratifs (Exocarta, EVpedia) permettent une collecte de toutes les données concernant la composition des EV afin de faciliter les recherches futures et l'accès à une littérature unifiée au niveau mondial.

La composition globale du contenu des sEV est détaillée dans la figure 31. Nous allons par la suite détailler plus précisément leur composition en protéines et en miARN.



Figure 31 : Représentation schématique de la composition des sEV : protéines, lipides, acides nucléiques, métabolites. D'après (Kalluri & LeBleu, 2020).

<u>Lipides</u>

La membrane lipidique délimitant les sEV se compose notamment de cholestérol, de phosphatidylsérine, de céramide, de sphingomyéline et de LBPA (acide lysobisphosphatidique) témoignant de l'origine endosomale des exosomes.

Protéines

On peut séparer les protéines contenues dans les sEV suivant leur localisation (membranaire ou luminale), selon leurs fonctions ou leur spécificité dans un contexte physiopathologique. Certaines protéines, si elles sont retrouvées ensemble, sont des marqueurs canoniques des exosomes : tétraspanines membranaires CD9/CD63/CD81, Alix, TSG101,

flotilline. On peut notamment analyser le contenu protéique des sEV par protéomique, le plus puissant étant de corréler plusieurs méthodes. L'analyse protéomique des EV permet une description fine de leur composition protéique, Haraszti *et al.* ont par exemple identifié par protéomique plus de 3500 protéines à partir de sEV issues de trois lignées cellulaires différentes (cellules souches mésenchymateuses, cellules de glioblastome et cellules de carcinome hépatocellulaire). Ils ont notamment décrit que l'enrichissement en protéines exosomales dans les sEV n'était pas similaire pour chaque lignée : les sEV de glioblastome sont par exemple fortement enrichies en tétraspanine 4, et les sEV de carcinome hépatocellulaire sont enrichies en CD81 et flotilline1 par comparaison à leur cellule d'origine (Haraszti et al., 2016). En plus de la présence des marqueurs canoniques d'exosomes, l'analyse protéomique des sEV permet de décrire certaines voies de signalisation potentiellement modulées par les protéines enrichies dans les sEV, que cela soit par rapport à leur type cellulaire d'origine (enrichissement), ou bien dans un contexte de comparaison de conditions physiologique et pathologique par exemple.

<u>miARN</u>

Parmi les composants enrichis au sein des sEV, on retrouve les miARN. Ces petits ARN non codants interviennent dans la régulation de nombreux processus biologiques, et leur enrichissement dans les sEV laisse supposer des effets potentiels à distance de leur cellule d'origine. En effet ces miARN peuvent être transférés *via* les sEV dans des cellules réceptrices distantes et différentes des cellules d'origine des sEV. Par exemple, des miARN contenus dans des EV d'origine parasitaire peuvent moduler la réponse immunitaire de l'hôte (J. Liu et al., 2019).

Dans le cadre de l'étude des infections congénitales virales au niveau placentaire, un cluster de microARN présente un intérêt particulier : le cluster de miARN C19MC. Il s'agit d'un large cluster présent spécifiquement dans le placenta de primates et dont certains miARN jouent un rôle antiviral au cours de la grossesse (Malnou et al., 2019). Donker *et al.* ont montré que les miR du C19MC sont les miARN les plus fortement exprimés dans des sEV issues de trophoblastes primaires humains (Donker et al., 2012). Les miARN présents dans les sEV trophoblastiques pourraient donc jouer un rôle essentiel sur le maintien de la physiologie gravidique (Ouyang et al., 2014).

2.1.5. Défis liés à la purification et à l'étude des sEV

Il existe de nombreuses méthodes de séparation des populations d'EV afin d'en purifier un sous type. En effet, les différents types d'EV présentent des tailles, des densités différentes et des marqueurs plus ou moins spécifiques. Ces propriétés permettent leur séparation grâce à des techniques basées sur de la précipitation, de la chromatographie d'exclusion de taille ou encore par des méthodes d'ultracentrifugation différentielle et/ou en gradient de densité (Figure 32). Le choix de la méthode de préparation des EV se fait en fonction du schéma expérimental, du type d'EV étudié et du type de biofluide dans lequel se trouvent les EV. Les différentes techniques possèdent des rendements de production, des niveaux de pureté et des facilités d'utilisation variables (Brennan et al., 2020).



Figure 32 : Représentation schématique des différentes méthodes de purification des EV A / Biofluide de départ B / Séparation par ultracentrifugation différentielle avec ou sans gradient de densité C/ Séparation par ultrafiltration D / Séparation par chromatographie d'exclusion de taille E / Séparation par fractionnement de flux F / Séparation par précipitation G / Séparation par immuno-affinité (Monguió-Tortajada et al., 2019).

Depuis l'émergence de la recherche sur les EV, quasiment chaque laboratoire, voire chaque équipe, utilisait un protocole différent pour purifier les EV ce qui explique la très grande variabilité dans les publications et la grande difficulté à comparer les données. Afin

d'homogénéiser les protocoles, en 2018 a été publié le MISEV (minimal information for studies of extracellular vesicles), qui donne une base commune de travail dans le domaine des EV, les différents protocoles de purification et de caractérisation des EV (Théry et al., 2018). En addition de ces recommandations, un outil « EV-Track » permet à chaque chercheur de confronter son protocole aux recommandations et ainsi d'abonder la base collaborative des différentes méthodologies (Van Deun et al., 2017).

En contexte infectieux, l'étude des sEV peut se compliquer : les sEV et certains virus présentent des caractéristiques biophysiques similaires (Hoen et al., 2016). Grâce à des densités différentes, il est parfois, mais pas toujours, possible de séparer les populations de sEV et de virus grâce à des gradients de densité (Théry et al., 2018).

Dans le contexte de l'étude des sEV placentaires au cours d'une infection par le hCMV, et avec le but d'étudier l'impact de ces sEV sur des NSC fragiles nous avons fait le choix d'utiliser une purification des sEV par ultracentrifugations différentielles avec une étape finale de gradient de densité. D'une part cela nous permet d'avoir des préparations pures et dénuées de particules virales infectieuses. D'autre part cette méthode nous permet de traiter notre volume important de liquide de culture. Ce choix technique reproductible implique que nous avons accès à des populations de sEV pures mais avec un rendement plutôt faible (Bergamelli et al., 2021).

2.2. Physiopathologie et vésicules extracellulaires

2.2.1. Principales fonctions des petites vésicules extracellulaires

Les vésicules extracellulaires ont longtemps été considérées comme des déchets amorphes, permettant aux cellules de se débarrasser d'un surplus de matériel et de limiter ainsi la surcharge cellulaire. On sait aujourd'hui que les EV sont des médiateurs biologiques essentiels en physiopathologie, chez les procaryotes comme les eucaryotes. Dans l'organisme, on retrouve des sEV d'origine variée dans virtuellement tous les fluides biologiques : plasma, urine, salive, liquide amniotique, liquide cérébro-spinal, lait maternel, larmes, lymphe, liquide articulaire... En effet, tous les types cellulaires produisent des vésicules extracellulaires (neurones, adipocytes, trophoblastes) qui exercent de nombreux rôles biologiques (Kalluri & LeBleu, 2020; Le Lay et al., 2021).

La composition des EV, notamment des exosomes, reflète certes l'état de la cellule productrice, mais n'est pas due au hasard : il existe une surreprésentation de certains composants cellulaires dans les sEV. Les phénomènes conduisant à cet enrichissement restent mal compris. Toutefois, la forte spécificité de certains composants (faible quantité cellulaire et forte quantité vésiculaire) peut laisser penser à une synthèse spécifique de vésicules à visée de délivrance fonctionnelle de molécules à d'autres cellules.

Les sEV jouent des rôles essentiels de communication intercellulaire à courte et longue distance. Des sEV d'un type cellulaire peuvent interagir avec : le même type cellulaire dans un organe distant ou bien d'autres types cellulaires au sein du même organe ou à distance. L'internalisation des sEV peut toutefois être favorisée dans certains types cellulaires. Cette communication intercellulaire a lieu dans des conditions physiologiques et pathologiques (Figure 33). En effet, la composition des sEV peut être altérée au cours de nombreux processus pathologiques (cancer, infection, inflammation) (Kalluri & LeBleu, 2020).



Figure 33 : Les populations de sEV constituent un système de communication cellule-cellule avec des fonctions très variables au sein de l'organisme (Kalluri & LeBleu, 2020).

Les sEV maintiennent activement la balance physiologique au sein de l'organisme, avec entre autres des effets essentiels sur : la régulation immunitaire, la réponse anti microbienne, le contrôle du cycle cellulaire. Les sEV peuvent également jouer un rôle dans la pathogénèse, en augmentant la diffusion de maladies (ex : métastase de mélanome), ou induisant une sensibilité accrue à certains composés ou microbes. Les sEV « exogènes » provenant de pathogènes, du microbiote ou de l'alimentation exercent également des fonctions biologiques, notamment sur le maintien d'une homéostasie gastro-intestinale (Berger et al., 2020). On parle alors des sEV comme inducteurs ou modérateurs de pathologies (Kalluri & LeBleu, 2020; J. Liu et al., 2019).

Comme décrit par Margolis et Sadovsky, il reste de nombreux défis à relever afin de mieux appréhender le « nano » monde des EV et de leurs vastes effets biologiques (Figure 34) (Margolis & Sadovsky, 2019).



Figure 34 : Les huit défis à résoudre pour mieux appréhender le champ de la biologie des vésicules extracellulaires : 1/La diversité de taille 2/Biogénèse des EV 3/Tri du cargo des EV 4/Analyse de la spécificité de cible 5/Les EV versus les virus 6/La distribution des EV à la cellule cible 7/Les différentes étapes d'utilisation des cargos 8/Les fonctions des EV en physiologie et en pathologie (Margolis & Sadovsky, 2019).

Le travail de recherche effectué au cours de cette thèse a visé à étudier certains aspects complémentaires des défis présentés en figure 34 notamment concernant les liens entre les virus et les EV ainsi que leur impact en physiopathologie au cours de l'infection congénitale par le hCMV.

2.2.2. <u>Biodistribution des petites vésicules extracellulaires</u>

Nous avons vu que les sEV exercent un panel très vaste d'effets biologiques, certaines fois à distance de leur zone de sécrétion. Elles sont présentes dans tous les fluides corporels et se déplacent donc dans tout l'organisme. On retrouve par exemple dans le sang des sEV originaires de tous les organes (foie, placenta, cerveau...). Mathieu *et al.* ont émis l'hypothèse qu'au vu du faible cargo possiblement chargé dans les sEV comparé à leurs impacts biologiques importants, le trafic et la distribution efficace des sEV pourraient expliquer en partie leurs effets modulateurs (Mathieu et al., 2019).

Dans le cadre de la thématique de l'infection congénitale par le hCMV, nous allons nous intéresser particulièrement au passage de deux barrières physiologiques de l'organisme par les sEV : la barrière placentaire et la barrière hématoencéphalique.

2.2.2.1. Barrière placentaire

Le placenta constitue une non-barrière pour la transmission des sEV, on retrouve des sEV d'origine maternelle dans le compartiment fœtal, et à l'inverse des sEV d'origine fœtale dans le sang maternel. En utilisant des rapporteurs, Sheller-Miller *et al.* ont étudié le trafic et les échanges intenses existant entre les deux versants et auquels les sEV participent de manière active (Sheller-Miller, Choi, et al., 2019).

Pour rappel, le placenta appartient aux annexes fœtales, avec une origine semi allogénique pour la mère. Il constitue l'interface d'échange entre le fœtus et la mère et les sEV d'origine placentaire peuvent être sécrétées dans le compartiment fœtal comme dans le compartiment maternel (Figure 35) (Czernek & Düchler, 2020).



Figure 35 : Illustration de la barrière placentaire humaine séparant les circulations maternelle et fœtale et présence des différents types de sEV (exosomes) (Czernek & Düchler, 2020).

2.2.2.2. Barrière hémato-encéphalique

Les sEV passent la barrière hématoencéphalique, chez la souris *in vivo* et dans des modèles de barrière hémato-encéphalique humaine *in vitro*. Ce passage se fait pour les sEV systémiques vers le cerveau, comme pour les sEV cérébrales vers le compartiment systémique (Figure 36).



Figure 36 : Passage bidirectionnel des sEV (en orange) au travers de la barrière hématoencéphalique (D'Anca et al., 2019).

Banks *et al.* ont testé le passage de différents types de sEV (d'origine humaine ou murine, issues de cellules saines ou de lignées cancéreuses) et ont conclu que bien que toutes les populations de sEV passent la barrière hémato-encéphalique chez la souris *in vivo*, elles n'ont pas toutes la même efficacité de transfert au cerveau. Par ailleurs, les mécanismes de transport des vésicules adoptés préférentiellement par un type de sEV sont variables : transporteurs spécifiques, transcytose ou encore système d'efflux (Banks et al., 2020).

L'utilisation des sEV comme cargo pour transporter des composés vers le cerveau en s'affranchissant partiellement de l'effet barrière est d'ailleurs très prometteur en termes de traitements. *In vitro*, des sEV délivrées par voie systémique permettent notamment le transfert de siARN et de shARN (petites ARN interférents) au cerveau (Alvarez-Erviti et al., 2011; Izco et al., 2019). Yuan *et al.* ont par ailleurs montré que les sEV de macrophages transportent des protéines au cerveau en cas d'inflammation cérébrale (Yuan et al., 2017). Le passage physiologique des sEV systémiques vers le cerveau peut également être utilisé par des microbes à leur avantage, afin de limiter leur immunogénicité et de disposer d'un transporteur de choix (Zhou et al., 2018).

Dans le sens inverse, concernant le passage des sEV depuis le cerveau vers le compartiment systémique, on peut avoir accès de manière non invasive (prise de sang périphérique) à des informations biologiques très spécifiques de l'état de physiologie ou de

pathologie cérébrale. En effet, les sEV cérébrales peuvent être enrichies avec un cargo spécifique de la pathologie en cours, et donc être utilisées comme moyen diagnostic ou comme outil de suivi (Skog et al., 2008).

Concernant la barrière hématoencéphalique fœtale ou néonatale, bien que partiellement fonctionnelle, elle reste une structure théorique : l'architecture cellulaire n'est pas en place, les cellules ne sont pas matures et de nombreux composés traversent cette « non-barrière » très permissive par rapport à la barrière hémato-encéphalique adulte. Il n'existe pas à notre connaissance d'étude spécifique sur le passage des sEV au travers de la barrière hématoencéphalique fœtale, mais la structure étant plus permissive qu'à l'âge adulte nous supposons que les sEV passent de manière *a minima* similaire, et selon toute probabilité de manière plus importante.

2.2.3. Vésicules extracellulaires et infections virales

2.2.3.1. Similarités de structure et de biogénèse

Les virus et les sEV présentent des caractéristiques biophysiques communes et des similarités de biogénèse (Hoen et al., 2016). A titre d'exemple, les virions de VIH-1 (120nm) sont enrichis en CD81 et CD63, et possèdent la même densité que les sEV. Une cellule infectée va donc pourvoir théoriquement produire une large gamme de particules : particules virales infectieuses, particules virales non infectieuses, EV contenant des composants de l'hôte mais également du virus (Figure 37).



Figure 37 : Similarités structurales entre virus et EV. Les cellules infectées par des virus enveloppés relarguent des vésicules contenant des facteurs viraux et cellulaires présents en équilibre variable. On retrouve d'une part des particules virales infectieuses (rouge) et d'autre part des EV de la cellule hôte « non modifiées » par le contexte infectieux (bleu). Entre les deux extrêmes du spectre, les cellules sécrètent des particules « virus-like », des virions défectueux non infectieux, et des EV modifiées par l'infection virale, contenant des facteurs viraux (Hoen et al., 2016).

La plupart des virus manipulent la machinerie cellulaire de leur cellule hôte, afin de produire de nouveaux virions, et cette machinerie peut également être impliquée dans la sécrétion des sEV. Par ailleurs, les étapes de relargage des virions et des sEV peuvent nécessiter des protéines communes (Rab, SNARE) (Hoen et al., 2016; Mathieu et al., 2019).

En cas de production de sEV dans une cellule infectée, les protéines, le contenu génétique viral ou même les virions de petite taille contenus dans le cytoplasme cellulaire peuvent être inclus dans les sEV néoformées. Certains virus de la famille des *Herpesviridae* manipulent par exemple les complexes ESCRT lors de la formation de leurs virions (Tandon et al., 2009). L'infection virale peut donc modifier la composition des sEV en médiateurs cellulaires et également induire l'apparition de molécules virales (Chahar et al., 2018).

En addition de certaines similarités de structure entre les sEV et les virions, leur parcours intracellulaire présente certaines étapes communes : entrée de la particule dans la cellule, relargage du contenu de la particule dans le cytoplasme. Les étapes suivantes divergent : le virus va manipuler la machinerie de sa cellule hôte afin de produire des néo-virions alors que les sEV relarguent simplement leur contenu (Figure 38).



Figure 38 : Schéma représentant l'entrée des EV et des virus dans une cellule et leur parcours intracellulaire. 1/Entrée des EV et des virus via un attachement spécifique à des récepteurs cellulaires 2/ Leur internalisation peut se faire via de nombreux mécanismes, dont l'endocytose médiée par la clathrine, l'endocytose médiée par la cavéoline et la macropinocytose. Il existe
également des mécanismes de fusion directe entre l'enveloppe et la membrane plasmique 3/Trafic intracellulaire : endosome précoce, endosome tardif ou endolysosome 4/ Les EV et les virus atteignent les compartiments endosomaux à pH bas 5/ Certaines protéines fusogéniques de surface des EV ou des virus déclenchent la fusion membranaire 6/ Cette fusion membranaire induit le relargage du contenu viral ou des EV dans le cytosol. Le cargo relargué des EV effectue alors ses fonctions dans la cellule réceptrice. Le matériel génétique viral et les protéines du tégument associées vont débuter le processus de transcription/réplication virale 7/ Contrairement aux EV, les virus détournent la machinerie cellulaire de leur hôte afin d'induire la réplication et l'assemblage viral 8/ Les virions néo produits sont ensuite relargués dans le milieu extérieur par exocytose, ou lyse cellulaire (Ouyang et al., 2021).

2.2.3.2. Impact des vésicules extracellulaires au cours d'infections virales

Les sEV peuvent limiter ou favoriser certains types d'infections virales, en fonction de leur origine, du caractère infecté ou non de la cellule productrice et du virus impliqué (Figure 39). Nous allons détailler certains exemples physiopathologiques de mécanismes pro ou anti viraux liées au sEV.



Figure 39 : Les sEV peuvent limiter ou promouvoir les infections virales : exemples de mécanismes impliquant les sEV dans des pathologies virales (Kalluri & LeBleu, 2020).

Limitation des infections virales :

Les sEV sécrétées en conditions physiologiques peuvent contenir un cargo qui va moduler ou limiter la transcription ou la réplication virale (par exemple INF α pour le virus de l'hépatite B), ou encore moduler la réponse immunitaire de l'hôte (Kalluri & LeBleu, 2020). Les sEV peuvent ainsi transférer APOBEC3G (cytidine deaminase) et augmenter la résistance d'une cellule naïve à l'infection par le VIH en interférant avec l'étape de transcription inverse. Les sEV permettent également, sans transférer de molécules directement antivirales, d'instaurer un climat antiviral en « informant » de la présence d'une infection virale les cellules environnantes et immunitaires par exemple *via* un transfert de ligands TLR. Les sEV, en exprimant à leur surface des potentiels antigènes viraux, peuvent également faciliter l'initiation de réponse immunitaire adaptative (Hoen et al., 2016). Les sEV d'origine trophoblastique jouent notamment un rôle antiviral sur les infections par le hCMV, le VSV et les *Herpesviridae*, détaillé en partie I.2.2.5 (Ouyang et al., 2016a).

Induction des infections virales

Certains virus peuvent détourner la machinerie de biogenèse des sEV à leur avantage afin d'en modifier le cargo. Les sEV peuvent ainsi jouer un effet proviral, *via* le transport de composants viraux chargés dans les sEV qui peuvent participer à la dispersion virale ou au priming de cellules naïves de toute infection à distance.

Certains virus de petite taille, peuvent par ailleurs être inclus en totalité dans une « enveloppe de sEV » ou une pseudo-enveloppe, et présenter ainsi à la cellule réceptrice un pattern de protéines d'enveloppe du soi sans protéines virales, par exemple grâce aux tétraspanines CD81 et CD9. Cette technique permet d'échapper partiellement à l'immunité antivirale de l'hôte et certains auteurs parlent même de cheval de Troie (Crenshaw et al., 2018; Gould et al., 2003; Kalluri & LeBleu, 2020).

Indépendamment des marqueurs de surface, les sEV issues de cellules infectées peuvent contenir des facteurs viraux ou cellulaires dérégulés par l'infection. Le transfert de ces facteurs peut induire un panel très large d'effets pro-viraux sur les cellules naïves de toute infection. On peut par exemple retrouver des modulations de la fonction immunitaire ou des effets sur la sénescence cellulaire. Le transfert de certains types de récepteurs ou de corécepteurs par les sEV à des cellules naïves peut également augmenter le pool de cellules sensibles à l'infection.

(Hoen et al., 2016). Enfin, l'effet pro-viral des sEV, en condition d'infection virale peut également être lié à une inhibition des mécanismes antiviraux physiologiques décrits précédemment, ce qui conduit de ce fait à établir un climat favorisant les infections.

2.2.3.3. Interaction entre vésicules extracellulaires et virus : exemples choisis

L'infection *in vitro* de cellules hépatiques par le virus de l'hépatite C induit la sécrétion de sEV contenant le génome viral ARN complet du virus, des protéines virales et même certaines particules virales. Ces sEV sont suffisantes pour induire une infection *de novo* dans une cellule naïve de toute infection. De plus, ces vésicules sont résistantes aux actions des anticorps neutralisants, et Ramakrishnaiah *et al.* font l'hypothèse que ce mécanisme de transfert viral *via* les sEV serait un des mécanismes d'évasion immunitaire du HCV (Ramakrishnaiah *et al.*, 2013).

Dans le cadre d'une infection transmise par un vecteur, on retrouve un niveau de complexité supplémentaire, car en plus du virus et de son hôte, le vecteur peut également produire des sEV présentant un effet biologique. Zhou *et al.* ont par exemple étudié la participation des sEV de tique dans la transmission du virus Langat (LGVT). Ils ont montré que les sEV produites par des cellules de tique infectées par le LGVT pourraient moduler la transmission du virus dans des cellules neuronales humaines. En effet, ces sEV contiennent des ARN viraux réplicatifs qui permettent *via* le transport des sEV de disséminer le virus (Zhou et al., 2018).

En plus des sEV d'origine exogène à l'organisme, on peut également trouver des sEV produites par le microbiote symbiotique notamment bactérien, qui peuvent également exercer des effets biologiques. Par exemple, les *Lactobacillus* vaginaux symbiotiques secrètent des sEV qui exercent un effet antiviral protecteur vis-à-vis de l'infection des tissus génitaux par le VIH-1 (Palomino et al., 2019). Ainsi, dans le développement actuel de la recherche sur l'équilibre hôte-microbiote, et ses liens avec la résistance aux infections exogènes, la prise en compte des sEV peut apporter un niveau de compréhension plus fin.

Au sein de la famille des *Herpesviridae*, Pegtel *et al.* ont montré que l'infection par EBV induit un chargement des sEV en miARN viraux et cellulaires, que ces miARN sont transmis et qu'ils exercent un effet dans des cellules naïves de toute infection EBV. Les auteurs ont émis l'hypothèse que la manipulation de ce mécanisme de transfert des miARN par l'EBV pouvait

expliquer partiellement le maintien de sa longue persistance au sein de l'organisme (Pegtel et al., 2010).

Enfin, Streck *et al.* ont analysé la sécrétion des sEV produites par des fibroblastes au cours d'une infection par le hCMV, ainsi que leurs effets biologiques. Ils ont montré que le hCMV, en induisant une manipulation de la voie ESCRT de biogénèse des sEV induit une augmentation du ratio de sEV produites. Les auteurs ont ensuite montré que les sEV issues de fibroblastes infectés par hCMV favorisent l'infection dans des cellules naïves, ce résultat sera développé et discuté dans la partie discussion (Streck et al., 2020).

2.2.3.4. Interactions entre le Cytomégalovirus et les vésicules extracellulaires

L'infection par le hCMV modifie la composition et la sécrétion des EV produites par les cellules infectées.

Zicari *et al.* ont montré qu'une partie de la population de sEV produites par des MRC5 infectées par une souche TB40 de hCMV exprimait à leur surface les protéines d'enveloppe virales gB et gH. Après purification des sEV et validation de leur marqueurs (population de sEV CD63 et Rab27 positives), les auteurs ont montré que 15% des EV de la population exprimaient la glycoprotéine virale gB à la surface des vésicules, 5% la protéine gH et 1% à la fois gB et gH (Zicari et al., 2018).

Le hCMV exploite la machinerie ESCRT au cours du processus de maturation des virions, or les complexes ESCRT sont également impliqués dans la voie de biogénèse endosomale des sEV. Tandon *et al.* ont proposé ainsi que le processing des protéines virales du hCMV dépend de la régulation de la biogénèse des corps multivésiculaires par les complexes ESCRT (Tandon et al., 2009).

Les phases finales d'enveloppement des virions lors du cycle réplicatif du hCMV ne sont pas entièrement connus. Fraile-Ramos *et al.* ont étudié en 2010 les rôles de Rab27 (Cf. partie I.2.1.3.2 – sécrétion des sEV) au cours de l'infection hCMV. Nous avons également vu que Rab27 était également impliqué dans la maturation des corps multivésiculaires permettant la sécrétion des sEV (Mathieu et al., 2019). Ces auteurs ont montré que l'infection par le hCMV augmente l'expression de Rab27 et induit son recrutement au sein des usines d'assemblage viral. Rab27 est de plus présente au sein des enveloppes virales néo-produites. Afin d'étudier plus précisément le rôle de Rab27, les auteurs ont réalisé un KO cellulaire de Rab27 au sein

duquel, à taux d'infection égal, le niveau de production de virion de hCMV était réduit. Ils ont donc conclu que l'expression de Rab27 et sa modulation par le hCMV étaient nécessaires au bon déroulement du processus d'infection productive (Fraile-Ramos et al., 2010). L'importance de Rab 27 a également été décrite récemment au cours des infections par le HSV (Bello-Morales et al., 2018).

Plus récemment, en analysant par protéomique le contenu protéique de virions de hCMV, Turner et al. ont retrouvé de très nombreuses protéines fréquemment présentes dans les sEV du type cellulaire hôte. Ce résultat préliminaire, en sus des données de la littérature, a conduit les auteurs à analyser de manière plus précise l'utilisation de la machinerie cellulaire de l'hôte, en particulier la voie de production des sEV, par le hCMV pour optimiser la production de virions (Figure 40). En utilisant des siARN, Turner et son équipe ont inactivé neuf protéines de l'hôte impliquées dans la machinerie cellulaire de la production des sEV. L'inactivation de sept de ces neuf protéines (VCP, COPB2, VAMP3, MYH9, TMED10, VPS35 et SEC22b) conduit à une diminution significative de la production de virions. Certains de ces KO se sont toutefois révélés induire des défauts de prolifération et des altérations de la morphologie cellulaire. Turner et al. se sont donc focalisés sur VAMP3 (protéine de membrane associée aux vésicules 3), dont le KO non cytotoxique induisait la plus forte diminution du taux de virions secondairement produits, et ils ont montré que VAMP3 est essentielle pour le trafic viral et pour le relargage des virions de hCMV. En addition de son rôle essentiel dans le trafic membranaire au cours de la maturation des sEV au sein des MVB, VAMP3 est donc également nécessaire au cycle viral réplicatif du hCMV (Turner et al., 2020).



Figure 40 : Le hCMV exploite la voie de biogénèse des sEV de la cellule hôte pour l'assemblage et la sortie des néovirons. Représentation schématique des étapes clés de la maturation des virions. Le hCMV induit la génération des compartiments d'assemblage des virions (vAC) afin de mettre en place une architecture au sein de la cellule hôte adaptée à l'assemblage et la sortie de ses virions. Les corps multivésiculaires sont en cas d'infection par le hCMV séquestrés dans les compartiments d'assemblage des virions et fournissent les membranes nécessaires à la production des virions et des sEV modifiées. En suivant, les virons et les sEV sont relargués dans le milieu extérieur (Turner et al., 2020).

Interactions entre les mécanismes de biogénèse virale, de vésicules extracellulaires et d'autophagie :

Les voies de transport vésiculaires intra et extracellulaire sont interconnectées, nous allons décrire plus en détail les interactions entre la voie de biogénèse des sEV, les voies de l'autophagie et l'infection par le hCMV.

L'autophagie est un processus biologique d'autolyse et de recyclage cellulaire grâce à la destruction intracellulaire de certaines vésicules ou organelles *via* les lysosomes. Ce terme générique regroupe trois sous types d'autophagie : la micro-autophagie, l'autophagie médiée par les chaperonnes et la macro-autophagie. Au cours de la micro-autophagie, les structures intracellulaires endommagées sont directement adressées au lysosome pour y être dégradées. Au cours de l'autophagie médiée par les chaperonnes, la chaperonne HSC70 identifie les protéines contenant un domaine d'adressage et les amène au lysosome grâce à une interaction avec la protéine membranaire lysosomale LAMP2A. La macro-autophagie consiste en un processus au cours duquel les autophagosomes et leur contenu vont maturer puis fusionner avec les lysosomes. Par la suite, nous utiliserons le terme autophagie pour nous rapporter au processus de macro-autophagie (Salimi et al., 2020; Xu et al., 2018).

Les processus de biogénèse des sEV et les mécanismes d'autophagie sont liés au niveau moléculaire comme au niveau vésiculaire (Figure 41). De nombreuses protéines Rab-GTPases (dont Rab8a, Rab11 et Rab27) contrôlent le transport de vésicules dans la voie sécrétoire et les processus d'autophagie à la membrane. Les protéines de l'autophagie (LC3B, ATG5 et ATG16L1) présentes à la membrane des corps multivésiculaires contribuent aussi à la formation des sEV. Le cargo « autophagique » peut alors être sécrété dans le milieu extracellulaire *via* ces sEV. De plus, les corps multivésiculaires peuvent fusionner avec les autophagosomes, formant des vésicules hybrides : les amphisomes. Le cargo des amphisomes peut être dégradé par les lysosomes, ou alternativement être relargué dans le milieu extracellulaire. Les processus par lesquels une partie du cargo des autophagosomes se retrouve dans les amphisomes pour être intégrée dans les sEV restent méconnus (Fader et al., 2008; Salimi et al., 2020).



Figure 41 : Interactions entre les voies d'autophagie et de biogénèse des sEV (Salimi et al., 2020).

Nous avons vu que les virus exploitent les voies de biogénèse des sEV afin de gagner en pathogénicité et d'échapper au système immunitaire de l'hôte (Gould et al., 2003). Certains virus, comme le virus de l'hépatite C et le hCMV modulent de plus l'autophagie de leur cellule hôte (Xu et al., 2018). En effet la macroautophagie peut notamment nuire au bon déroulement du cycle viral *via* la destruction de protéines ou organelles essentielles aux usines de réplication virales et participer ainsi à la lutte contre les pathogènes intracellulaires.

Aux temps très précoces de l'infection par hCMV (4-8 heures post infection), le virus stimule la macro-autophagie de manière indépendante de l'expression des gènes viraux, en effet cette stimulation est présente pour les virus complets comme pour les virus inactivés aux UV (Chaumorcel et al., 2012).

Chaumorcel *et al.* ont également montré que le hCMV inhibe aux temps plus tardifs la formation des autophagosomes. Les auteurs ont suivi la distribution de protéines de l'autophagie (LC3, LC3II et p62) et ont montré que l'infection par le hCMV inhibe précocement l'autophagie *via* un mécanisme impliquant directement les protéines virales et que cette inhibition se maintient jusqu'à 3 jours post infection (Chaumorcel et al., 2008).

Afin de comprendre plus en détail les mécanismes viraux impliqués dans cette modulation de l'autophagie par le hCMV, la même équipe a exploré les protéines virales impliquées. La protéine candidate retenue a été TRS1, en effet cette protéine virale du hCMV est un homologue fonctionnel d'une protéine de l'HSV-1 elle-même décrite pour inhiber l'autophagie. L'expression de la protéine virale TRS1, en dehors de tout contexte infectieux, est suffisante pour induire une diminution du nombre d'autophagosomes et d'autolysosomes dans un modèle d'autophagie induite (Chaumorcel et al., 2012).

Le hCMV exprime une autre protéine virale, IRS1, très homologue à TRS1. Mouna *et al.* ont montré que l'expression de IRS1 ou de TRS1 inhibe le processus d'autophagie *via* leurs interactions avec la protéine Becline-1. De manière très intéressante, grâce à un traitement shARN, les auteurs ont également montré que la stimulation de l'autophagie induit une augmentation de la réplication virale, et que, *a contrario*, l'inhibition de l'autophagie réduit la réplication virale de hCMV (Mouna et al., 2016).

Par la suite, Taisne *et al.* ont montré que le hCMV détourne le mécanisme d'autophagie cellulaire, comme vu précédemment *via* TRS1, afin d'optimiser le processus d'enveloppement des virions au sein des compartiments d'assemblage viraux. Cette étroite proximité géographique conduit d'ailleurs certaines particules virales à contenir des protéines de l'autophagie (Taisne et al., 2019).

Au travers de ces exemples, on voit que les voies de biogénèse du hCMV et des sEV s'entremêlent, et que le hCMV peut détourner les mécanismes cellulaires de production des sEV ou de réponse cellulaire à son propre avantage afin de produire ses virions ou de gagner en pathogénicité.

2.2.4. Petites vésicules extracellulaires et grossesse

2.2.4.1. Effets physiologiques des vésicules extracellulaires placentaires

Après nous être intéressés aux interactions entre sEV et infections, et plus particulièrement l'infection par le hCMV, nous allons regarder plus en détail les fonctions des sEV spécifiquement originaires du placenta et de ses différentes structures. En cours de grossesse on retrouve des sEV d'origine placentaire dans plusieurs compartiments : sang maternel, sang fœtal et liquide amniotique. Les sEV placentaires peuvent avoir des effets sur le

versant maternel comme sur le versant fœtal (Sadovsky et al., 2020). En effet les sEV d'origine placentaire sont exportées vers le fœtus comme vers la circulation systémique maternelle (Figure 42) (Czernek & Düchler, 2020).



Figure 42 : Contribution des sEV à la communication maternofœtale. Les flèches jaunes représentent les sEV placentaires qui sont retrouvées chez le fœtus comme chez la mère. PE = pré-éclampsie, GDM = diabète gestationnel (Czernek & Düchler, 2020).

Les sEV placentaires retrouvées dans le liquide amniotique peuvent venir de deux voies : directement par passage transplacentaire dans la cavité amniotique, et par ultrafiltrat pulmonaire ou rénal (composants du liquide amniotique) dans la mesure où les sEV placentaires sont présentes dans la circulation sanguine fœtale. Les EV présentes dans le sang fœtal sont d'ailleurs à 45 % d'origine placentaire (Miranda et al., 2018). Les EV placentaires retrouvées dans le liquide amniotique ou le sérum maternel peuvent ainsi être des biomarqueurs de choix dans le suivi de l'état placentaire (Ebert & Rai, 2019). Au niveau sanguin notamment, l'analyse des sEV permet de manière non invasive le suivi de certains paramètres placentaires pouvant être utiles dans le diagnostic, le pronostic ou le suivi de certaines pathologies comme le retard de croissance intra-utérin (Miranda et al., 2018) ou la pré-éclampsie (Pillay et al., 2016; Salomon et al., 2017; Vargas et al., 2014).

On peut, à partir de prélèvement sanguin isoler les sEV d'origine placentaire par un tri, en ciblant des molécules spécifiques du placenta comme la PLAP (phosphatase alcaline placentaire) (Sabapatha et al., 2006). Cet isolement permet d'étudier spécifiquement les sEV placentaires, leur nombre, leur composition et leurs effets au cours de différents processus physiopathologiques ou à différents termes de grossesse. En effet au cours de pathologies gravidiques (pré-éclampsie, RICU, accouchement prématuré, diabète gestationnel) les sEV placentaires peuvent être modifiées, en quantité et/ou en composition (Figure42) (Jin & Menon, 2018).



Figure 43 : Représentation schématique des modifications des sEV en cours de grossesse physiologique ou pathologique et impacts potentiels sur la santé gravidique (Jin & Menon, 2018).

Par exemple dans le diabète gestationnel, les sEV placentaires, plus nombreuses qu'en conditions physiologiques, présentent une activité enzymatique modifiée et leur composition en miARN devient spécifique du diabète gestationnel par rapport aux grossesses contrôles (Kandzija et al., 2019; Nair et al., 2018).

Les processus précoces de migration et l'invasion des cellules trophoblastiques dans l'endomètre sont essentiels au bon développement placentaire et fœtal, notamment en assurant *via* le remodelage vasculaire maternel une communication maternofœtale et des apports suffisants au fœtus. Cette étape de placentation, cruciale pour le bon déroulement de la grossesse, peut être dérégulée notamment par des phénomènes hypoxiques. Salomon *et al.* ont montré que la bioactivité et la quantité des sEV issues de cellules cytotrophoblastiques est augmentée en conditions d'hypoxie, augmentant la prolifération et la migration du trophoblaste extra-villeux. Leur hypothèse est qu'en conditions limitantes d'oxygène, les modifications de

stress au sein des cellules cytotrophoblastiques conduisent à une augmentation du nombre et de la bioactivité des sEV. Ce mécanisme de régulation pourrait être selon eux présent de manière physiologique et/ou de manière réactionnelle à certains stress (Salomon et al., 2013). La régulation de la placentation est très fine, et il est possible que les sEV, issues de cytotrophoblaste villeux et extra-villeux, du syncytiotrophoblaste, ou du versant maternel assurent l'équilibre entre invasion de l'œuf et respect des structures maternelles.

Les EV d'origine placentaire ou trophoblastique possèdent de nombreuses capacités immuno-modulatrices (Tong et al., 2018). Les sEV placentaires sont impliquées *via* leur effet immunosuppresseur dans le maintien de l'état de tolérance immunitaire de la mère pour sa semiallogreffe fœtale (Hedlund et al., 2009). Sabapatha *et al.* ont montré que les sEV placentaires suppriment certains composants de la réponse cellulaire T (CD3-zeta et JAK3), cet effet immuno-modulateur pourrait jouer un rôle dans la réponse à certains pathogènes ou certains stress exogènes en cours de grossesse (Sabapatha et al., 2006). Les sEV placentaires possèdent également un rôle modulateur de l'apoptose *via* le transport de ligands Fas de la famille des TNF et de molécules TRAIL. *In vitro*, ils jouent également un rôle pro-apoptotique sur des cellules immunitaires activées, ce qui valide le rôle essentiel du placenta et de ses médiateurs dans la régulation immunitaire (Stenqvist et al., 2013).

Concernant la fin de la grossesse, il semblerait que les sEV participent à la mise en travail et à l'accouchement. Dans un modèle murin, l'injection de sEV issues de souris au stade tardif de grossesse à des souris en milieu de grossesse induit un accouchement prématuré, ce qui n'est pas retrouvé avec l'injection de sEV issues de stades précoces de la grossesse. Cet effet sur la mise en travail pourrait s'expliquer par une augmentation de médiateurs inflammatoires au niveau génital induite par un effet paracrine des sEV (Sheller-Miller, Trivedi, et al., 2019).

2.2.4.2. Trafic et internalisation des vésicules extracellulaires trophoblastiques

Au cours de la grossesse, les sEV trophoblastiques peuvent être internalisées par de nombreux types cellulaires (trophoblastes, fibroblastes placentaires, cellules endothéliales, monocytes circulants, cellule B, plaquettes ...) et donc modifier potentiellement des voies de signalisation très variées. Les sEV trophoblastiques sont également caractérisées par la présence

de syncitine 1 et 2, essentielles pour l'internalisation des sEV d'origine trophoblastique dans leurs cellules cibles (Vargas et al., 2014).

Récemment, Li *et al.* ont montré que les sEV trophoblastiques pénètrent dans des cellules cibles (fibroblastes placentaires et cellules endothéliales vasculaires utérines) *via* les processus de macropinocytose et d'endocytose médiée par la clathrine. L'équipe a également suivi leur route intracellulaire et ils ont montré qu'en sus de la voie classique d'adressage des sEV aux endosomes précoces et tardifs et lysosomes, le cargo en miARN des sEV trophoblastiques était adressé aux P-Bodies. Cette donnée pourrait expliquer en partie les mécanismes régulateurs par lesquels les miARN contenus dans les sEV trophoblastiques modulent la biologie de leurs cellules cibles (H. Li et al., 2020).

2.2.4.3. Normalisation des vésicules extracellulaires placentaires

Il ne faut pas perdre de vue que le placenta évolue en cours de grossesse (taille, poids, fonctions) et que la sécrétion ou la composition des sEV placentaires peuvent s'en retrouver modifiées. Il convient donc à la mention de sEV placentaires, de préciser s'il s'agit de sEV produites au premier trimestre ou en fin de grossesse à partir d'un placenta à terme. Liu *et al.* ont par exemple en 2018 décrit que la « charge », c'est-à-dire la quantité de vésicules placentaires sériques au premier trimestre de grossesse, entre 8 et 12 semaines de gestation, reste constante rapportée au poids théorique de tissu placentaire correspondant au terme (assez similaire en début de grossesse) (H. Liu et al., 2018). Dans le sang total d'une patiente enceinte, la concentration en sEV au premier trimestre de grossesse est de l'ordre de 2.10¹¹ sEV/mL de plasma, dont 15% de sEV positives pour PLAP (Sarker et al., 2014). Pour l'étude des sEV placentaires en fin de grossesse plusieurs biais peuvent se présenter dans la normalisation, le poids du placenta étant très variable : variabilité interindividuelle mais aussi intra-individuelle, avec aux 6^{ème} et 9^{ème} mois une prise de poids très importante de l'organe.

L'analyse des sEV placentaires présentes dans le sang maternel peut être faite assez facilement grâce à une normalisation par rapport au terme et au volume de sang. La comparabilité des études des sEV placentaires produites par du placenta en culture est plus difficile : certaines équipes isolent les cellules trophoblastiques depuis le placenta (Ouyang et al., 2016), d'autres irriguent le placenta et collectent le filtrat (Tong et al., 2016) et d'autres mettent en culture des explants placentaires (Bergamelli et al., 2021). Les temps de récolte des sEV sont également très variables, et plus ou moins adaptés à l'étude de certains processus biologiques aigus ou chroniques.

En conclusion, l'étude des sEV trophoblastiques, bien qu'en plein essor, doit répondre à un certain nombre de défis, concernant à la fois la biogénèse des sEV et particulièrement en fonction des différents types cellulaires placentaires, leur trafic spécifique et leurs effets biologiques en physiopathologie (Sadovsky et al., 2020).

2.2.5. Vésicules extracellulaires placentaires et pathologies infectieuses

Nous nous intéressons particulièrement aux sEV placentaires au cours de l'infection par le hCMV. Nous allons détailler les données de la littérature concernant leurs effets connus ou hypothétiques en cours de grossesse.

En 2013, Delorme-Axford et son équipe ont étudié le potentiel de résistance des trophoblastes placentaires aux virus suivants : Poliovirus, VSV, virus de la vaccine, HSV-1 et hCMV. Ils ont montré que les trophoblastes primaires issus de placentas à terme résistent aux infections par comparaison à des cellules contrôles, et ont fait l'hypothèse qu'ils transfèrent également cette résistance à des cellules receveuses via une délivrance spécifique de miARN contenus dans des sEV. Afin de valider ce mécanisme antiviral, les auteurs ont transfecté des cellules U2OS (ostéosarcome) n'exprimant pas naturellement le cluster de miARN C19MC avec un BAC contenant le cluster C19MC complet. Ils ont montré que ces cellules transfectées présentaient un taux d'infection par le VSV réduit par rapport aux contrôles. Au niveau plus mécanistique, le transfert des sEV issues de trophoblastes contenant des miRNA du C19MC induit une augmentation de l'autophagie dans des cellules réceptrices. Et les auteurs ont par la suite montré que l'inhibition pharmacologique de l'autophagie restaure un niveau d'infection initial dans des cellules U2OS transfectées exprimant le cluster C19MC. Les auteurs ont donc conclu que le mécanisme d'autophagie était nécessaire à l'effet antiviral des miARN du C19MC (Delorme-Axford et al., 2013). Cette étude a posé les bases d'un domaine de recherche en pleine expansion, celui des effets biologiques des sEV trophoblastiques au cours des infections virales et au sein duquel s'inscrit notre travail de recherche.

Plus récemment, Ouyang *et al.* ont analysé les EV de différents types (exosomes, microvésicules et corps apoptotiques) produits par des placentas à terme, dans les 72 heures suivant un accouchement physiologique. Au-delà de leur composition assez similaire en

miARN (du cluster C19MC entre autres), la population des « exosomes » présentait un profil protéique et phospholipidique différent de celui des microvésicules et corps apoptotiques. Les auteurs se sont intéressés aux effets fonctionnels de ces trois populations d'EV sur une future infection. Ils ont montré que la population des exosomes était la seule à présenter un effet antiviral significatif au cours des infections par le VSV, le virus choisi comme modèle dans cette étude. Ce même effet antiviral a également été retrouvé en traitant les cellules avec des sEV trophoblastiques issues de plasma maternel total de patientes présentant une grossesse d'évolution normale (Ouyang et al., 2016b). Ce travail a posé le rationnel de notre choix de nous intéresser spécifiquement aux sEV pour évaluer le potentiel pro et antiviral de ces vésicules placentaires au cours de l'infection hCMV.

Les modulations de l'expression des miARN placentaires au cours de la grossesse pourraient expliquer en partie, au vu entre autres de leurs effets antiviraux, que les infections n'ont ni la même prévalence ni la même symptomatologie aux différents trimestres de grossesse (Malnou et al., 2019). L'étude de l'expression en conditions physiopathologiques de ces miARN ainsi que leurs effets en conditions d'infections pourraient apporter de nouvelles connaissances très utiles notamment à visée de développement de biomarqueurs ou de traitements (Dumont et al., 2017).

2.2.6. Petites vésicules extracellulaires et applications biomédicales

Les sEV ont un potentiel énorme en termes d'applications biomédicales et la recherche translationnelle sur cette thématique est en plein essor. On peut distinguer deux catégories principales où les sEV pourraient conduire à des innovations biomédicales :

2.2.6.1. Les vésicules extracellulaires comme outil thérapeutique

De nombreuses études, dans des modèles humains ou animaux, se sont intéressées aux effets thérapeutiques des EV, de différentes origines et en conditions pathologiques variables.

Les sEV issues de cellules souches mésenchymateuses améliorent la cicatrisation et la récupération des brûlures radio-induites. Même si les mécanismes précis de cette action ne sont pas entièrement compris, ces sEV exercent notamment des potentiels d'immuno-modulation, de stimulation de l'angiogenèse et favorisent la survie et la prolifération cellulaire (Pu et al.,

2020). En se rapprochant plus d'un contexte périnatal, Thomi *et al.* ont récemment montré dans un modèle murin que l'administration intranasale de sEV produites par des cellules souches mésenchymateuses issues de la gelée de Wharton (composant du cordon ombilical), permet d'améliorer les défauts neuro-développementaux liés à des lésions cérébrales périnatales hypoxiques et de limiter la destruction de la matière blanche et grise chez ces souris (Thomi et al., 2019). Les sEV issues des cellules souches présentent donc des candidats de choix, bioactifs, peu immunogènes, pour traiter ou améliorer la prise en charge de pathologies variées.



Figure 44 : Internalisation cellulaire des sEV thérapeutiques (Kalluri & LeBleu, 2020).

Les sEV peuvent également être utilisées comme « super » véhicule de transport au sein d'un organisme afin de délivrer à distance des molécules. Cette utilisation des sEV comme vecteurs, du soi et peu immunogènes, pourrait théoriquement permettre de distribuer de manière efficace des molécules thérapeutiques, même au sein d'organes difficiles d'atteinte par des voies de distribution classiques. Les différentes voies potentielles d'internalisation des sEV thérapeutiques sont détaillées en figure 44.

2.2.6.2. Les vésicules extracellulaires comme outil diagnostic et pronostic

Les sEV, présentes dans tous les fluides biologiques, peuvent être prélevées de manière non invasive et permettre un suivi de l'état d'un organe, ou bien encore être utilisées comme marqueurs de diagnostic précoce, comme outil de pronostic ou comme méthode de monitoring d'une pathologie. On parle de « biopsie liquide » : on peut avoir accès indirectement grâce aux sEV à des informations biologiques provenant d'organes lointains ou difficilement accessibles. De plus, le contenu est protégé de la dégradation par sa présence intra-vésiculaire (Kalluri & LeBleu, 2020).

L'étude des sEV comme biomarqueurs a débuté dans le cadre de la prise en charge des cancers et s'est rapidement développée dans le cadre d'autres contextes physiopathologiques. Dans le cas particulier de la grossesse, les sEV placentaires présentent un intérêt particulier par leur capacité de transporter des miARN spécifiques qui sont des candidats de choix dans le suivi des grossesses compliquées ou des atteintes fœtales.

Comme vu dans la partie I.2.2.4.1 (sEV et grossesse), les sEV placentaires peuvent être modifiées en composition ou en sécrétion au cours de pathologies gravidiques. Au cours des plus fréquentes comme les défauts hyper-tensionnels gravidiques ou le diabète gestationnel, les sEV placentaires jouent à la fois un rôle dans la modulation de la pathologie, mais peuvent également être utilisées comme biomarqueurs. Concernant les atteintes fœtales, les niveaux d'expression de certains miARN contenus dans les sEV présentes dans la circulation maternelle peuvent être modifiés par certaines pathologies ou malformations fœtales comme la trisomie 21, des défauts de fermeture du tube neural ou encore certaines malformations cardiaques (Yang et al., 2020). La compréhension fine et exhaustive de la composition des sEV au cours de plusieurs contextes physiopathologiques gravidiques pourrait permettre, à terme, des diagnostics plus précoces et des données pronostiques supplémentaires concernant l'évolution de la grossesse et les possibles atteintes fœtales ou néonatales.

Notre deuxième axe de travail de recherche s'intéresse aux sEV placentaires, *ex vivo* et *in vivo*, comme biomarqueurs potentiels au cours de l'infection congénitale par le hCMV.

OBJECTIFS ET HYPOTHESES

OBJECTIFS ET HYPOTHESES

Au cours de l'infection congénitale, le hCMV infecte directement les progéniteurs neuronaux. Toutefois, cet impact direct n'explique ni la grande variabilité des lésions cérébrales retrouvées, ni leur degré de sévérité. La littérature nous a montré que les interactions entre sEV et virus sont fréquentes, et que les sEV peuvent participer à la pathogénèse d'une infection en modulant la réponse de l'hôte ou en permettant le transfert de médiateurs viraux. Dans le cas précis de la grossesse physiologique, les sEV placentaires et trophoblastiques exercent un rôle antiviral. Nous avons cherché à explorer l'hypothèse selon laquelle, au cours d'une infection par le hCMV, les sEV placentaires pourraient perdre cet effet antiviral, voire exercer un effet pro-viral facilitant la diffusion virale au niveau fœtal. Par ailleurs, les sEV placentaires, présentes sur les versants maternels et fœtaux, ne sont pas seulement des médiateurs exerçant des effets biologiques : ces vésicules permettent de réaliser des « biopsies liquides » non invasives. Ainsi, les sEV placentaires sériques sont des candidates de choix pour le développement de nouveaux biomarqueurs de pronostic ou de suivi des grossesses pathologiques y compris en contexte infectieux.

Ce rationnel m'a conduit à développer en parallèle trois axes de travail au cours de ma thèse :

- Dans une première partie fondamentale, j'ai tout d'abord comparé la composition et la sécrétion des sEV trophoblastiques issues de cellules infectées par le hCMV ou non infectées. Les résultats de protéomique ont notamment mis en évidence un changement de composition protéique qui nous a conduit à faire l'hypothèse que les sEV trophoblastiques pourraient moduler la biologie des cellules fœtales au cours de l'infection par le hCMV. En suivant, j'ai donc analysé l'impact des sEV issues de trophoblastes infectés sur la permissivité des cellules fœtales naïves à une future infection par le hCMV.
- Dans une deuxième partie, plus translationnelle, j'ai cherché à compléter les résultats obtenus *in vitro* avec des modèles plus proches de la physiopathologie de l'infection congénitale. Pour ce faire, j'ai étudié les effets de l'infection par le hCMV sur les sEV produites par des histocultures placentaires *ex vivo*.

Enfin, j'ai constitué dans un troisième temps une collection d'échantillons biologiques
provenant de patientes enceintes en séroconversion hCMV avec pour but, à terme,
de valider *in vivo* nos résultats au plus proche de la clinique.

L'ensemble de ces travaux a conduit à une compréhension plus fine de la physiopathologie de l'infection congénitale par le hCMV, notamment concernant l'impact des sEV placentaires, et à de nouvelles perspectives de recherche translationnelle qui seront discutées à la fin de ce manuscrit.

RESULTATS

RESULTATS

- Impact de l'infection par le Cytomégalovirus sur les petites vésicules extracellulaires trophoblastiques et conséquences sur les cellules fœtales
 - 1.1. <u>Article « Le Cytomégalovirus humain modifie la sécrétion et la</u> <u>composition des petites vésicules extracellulaires trophoblastiques,</u> <u>favorisant ainsi l'infection des cellules fœtales receveuses »</u>

Les sEV trophoblastiques exercent un effet antiviral au cours d'une grossesse physiologique, et les infections virales peuvent moduler la sécrétion, la composition ainsi que les fonctions biologiques des sEV. Dans ce contexte, grâce à un modèle de cellules trophoblastiques HIPEC, nous avons évalué l'impact de l'infection par le hCMV sur la sécrétion et la composition des sEV trophoblastiques ainsi que les impacts fonctionnels de ces sEV trophoblastiques. Ce travail est présenté dans l'article joint intitulé « *Le Cytomégalovirus humain modifie la sécrétion et la composition des petites vésicules extracellulaires trophoblastiques, favorisant ainsi l'infection des cellules fœtales receveuses* », actuellement en cours de relecture par les collaborateurs avant soumission à l'hiver.

Dans cet article, et de manière similaire aux descriptions obtenues dans d'autres types cellulaires, nous avons montré que l'infection par le hCMV augmente le taux de sécrétion des sEV trophoblastiques, qui présentent par ailleurs une taille relative réduite. (Streck et al., 2020) Concernant la composition protéique des sEV, nos données de protéomique ont mis en évidence que leur profil protéique est modifié au cours de l'infection. Nous avons décrit que l'infection par le hCMV induit des modifications d'expression de protéines cellulaires, notamment de protéines impliquées dans les voies d'autophagie et de réponse immunitaire, et d'autre part un enrichissement en protéines virales du hCMV. Ces protéines des sEV, virales et cellulaires, pourraient exercer sur des cellules naïves distantes un effet de facilitation d'une infection future à hCMV. Nous avons donc analysé l'impact de ces sEV trophoblastiques modifiées sur la permissivité virale de fibroblastes fœtaux et de cellules souches neurales. Nous avons tout d'abord validé que les cellules fœtales internalisent les sEV trophoblastiques de manière temps

et dose dépendante. Par la suite, nous avons montré que l'incubation des cellules fœtales avec des sEV issues de cellules trophoblastiques infectées par le hCMV augmente significativement le taux d'infection par rapport à une condition contrôle avec des sEV de cytotrophoblastes non infectés. Cette facilitation de l'infection dans les cellules souches neurales naïves a également été retrouvée avec des sEV issues de placentas précoces infectés par le hCMV *ex vivo* et avec des sEV issues de liquide amniotique de patientes enceintes en séroconversion hCMV.

Article <u>« Le Cytomégalovirus humain modifie la sécrétion et la</u> <u>composition des petites vésicules extracellulaires trophoblastiques</u>, favorisant ainsi l'infection des cellules fœtales receveuses »

Actuellement soumis à *Journal of Extracellular Vesicles* et déposé sur BioRxiv (en date du 17 novembre 2021) :

TITLE

Human Cytomegalovirus modifies placental small extracellular vesicle secretion and composition towards a proviral phenotype to enhance infection of fetal recipient cells

AUTHORS

Mathilde Bergamelli ¹, Hélène Martin ¹, Yann Aubert ¹, Jean-Michel Mansuy ², Marlène Marcellin ³, Odile Burlet-Schiltz ³, Ilse Hurbain ^{4,5}, Graça Raposo ^{4,5}, Jacques Izopet ^{1,2}, Thierry Fournier ⁶, Alexandra Benchoua ⁷, Mélinda Bénard ^{1,8}, Marion Groussolles ^{1,9,10}, Géraldine Cartron ¹¹, Yann Tanguy le Gac ¹¹, Nathalie Moinard ^{12,13}, Gisela D'Angelo ⁴ and Cécile E. Malnou ¹*

AFFILIATIONS

¹ Institut Toulousain des Maladies Infectieuses et Inflammatoires (Infinity), Université de Toulouse, INSERM, CNRS, UPS, Toulouse, France.

² CHU Toulouse, Hôpital Purpan, Laboratoire de Virologie, Toulouse, France.

³ Institut de Pharmacologie et de Biologie Structurale, IPBS, Université de Toulouse, CNRS, UPS, Toulouse, France.

⁴ Institut Curie, CNRS UMR144, Structure et Compartiments Membranaires, Université Paris Sciences et Lettres, Paris, France.

⁵ Institut Curie, CNRS UMR144, Plateforme d'imagerie cellulaire et tissulaire (PICT-IBiSA), Université Paris Sciences et Lettres, Paris, France.

⁶ Physiopathologie & pharmacotoxicologie du placenta humain, microbiote pré & postnatal, 3PHM, INSERM, Université de Paris Sciences et Lettres, Paris, France.

⁷ CECS, I-STEM, AFM, Evry, France.

⁸ CHU Toulouse, Hôpital des Enfants, Service de Néonatalogie, Toulouse, France.

⁹ CHU Toulouse, Hôpital Paule de Viguier, Service de Diagnostic Prénatal, Toulouse, France.

¹⁰ Equipe SPHERE Epidémiologie et Analyses en Santé Publique: Risques, Maladies chroniques et handicaps, Université de Toulouse, INSERM UMR1027, UPS, Toulouse, France.

¹¹ CHU Toulouse, Hôpital Paule de Viguier, Service de Gynécologie Obstétrique, Toulouse, France.

¹² Développement Embryonnaire, Fertilité, Environnement (DEFE), INSERM UMR 1203, Université de Toulouse et Université de Montpellier, France.

¹³ CECOS, Groupe d'activité de médecine de la reproduction, CHU Toulouse, Hôpital Paule de Viguier, Toulouse, France.

KEYWORDS

hCMV, congenital infection, extracellular vesicles, placenta, cytotrophoblast, neural stem

cells

ABSTRACT

Although placental small extracellular vesicles (sEVs) are extensively studied in the context of pregnancy, little is known about their role during human cytomegalovirus (hCMV) congenital infection, especially at the beginning of pregnancy. In this study, we examined the consequences of hCMV infection on sEVs production and composition using an immortalized cytotrophoblast cell line derived from first trimester placenta. By combining complementary approaches of biochemistry, imaging techniques and quantitative proteomic analysis, we showed that hCMV infection increased the yield of sEVs produced by cytotrophoblasts and modified their protein composition towards a proviral phenotype. We further demonstrated that sEVs secreted by hCMV-infected cytotrophoblasts potentiated infection in naive recipient cells of fetal origin, including neural stem cells. Importantly, the enhancement of hCMV infection was also observed with sEVs prepared from either an *ex vivo* model of infected histocultures from early placenta or from the amniotic fluid of patients naturally infected by hCMV at the beginning of pregnancy. Based on these findings, we propose that placental sEVs could be key actors favoring viral dissemination to the fetal brain during hCMV congenital infection.

INTRODUCTION

Human cytomegalovirus (hCMV) belongs to the *Herpesviridae* family and its prevalence is of 50 to 90 % in global human population. Most of the hCMV infections occurring among immunocompetent adults induce an asymptomatic acute replication phase followed by a lifelong persistent latent state. However, hCMV primo-infection, reinfection and/or reactivation may severely compromise the health of immunocompromised people, and is a major issue during pregnancy [1-3]. Indeed, congenital infection by hCMV affects 1% of live births in western countries, making hCMV the most frequently transmitted virus *in utero* [3, 4], causing placental and fetal impairments of variable severity. The most severe consequences are observed when transmission occurs during first trimester or in peri-conceptional period [5]. Infection of the placenta itself allows the virus to actively replicate and enable its further access to the fetus [4, 6-10]. The infected placenta can develop a pathology that may lead to miscarriage, premature delivery, *intra* uterine growth retardation or even fetal death [3, 5, 11]. On the other side, the infection being the most common cause of brain malformations and deafness of infectious origin [3, 12-15]. Despite the extensive research conducted so far, the

pathophysiology of hCMV infection remains unclear, especially concerning potential factors which may explain the wide variety of clinical manifestations and their severity [3].

In the course of hCMV congenital infection, the placenta is a central key organ, which is the target of viral replication allowing further vertical transmission towards the fetus. Amongst the numerous placental functions, a recently described and extensively studied mode of communication between both maternal and fetal sides consists in the production of placental extracellular vesicles (EVs) [16, 17]. EVs are membranous vesicles secreted by cells in both physiological and pathological situations, which main subtypes can be distinguished depending on their biogenesis and size into small EVs (sEVs) and large EVs (lEVs). They are specifically composed of various molecules such as proteins, lipids and coding and non-coding RNAs [18, 19]. Once released into the extracellular space, EVs can be internalized by other cells, in their immediate environment or within long distances, wherein they exert regulatory roles [20]. For example, there can be uptaken by Natural Killer cells [21, 22] or by primary placental fibroblasts [23]. Although the understanding of the biological relevance of placental EVs in vivo remains limited, recent findings highlight their roles in cell-cell communication underlying the feto-placenta-maternal dialogue during pregnancy [24-26]. Interestingly, placental EVs content is altered upon gestational diseases such as preeclampsia, preterm birth or gestational diabetes mellitus, and recent literature points towards a putative role of dysregulated placental EVs during pathological pregnancies [25, 27-32]. Besides, previous works indicate that term placental EVs may confer an antiviral activity to recipient cells, notably via the presence of microRNAs deriving from the C19MC cluster [33-35].

Although placental EVs are extensively studied in the context of pregnancy diseases, little is currently known about their role during hCMV congenital infection, especially at the very beginning of pregnancy where most severe sequelae take their origin. A recent study from our team described a dysregulation of the surface expression of placental sEV markers upon hCMV infection in an *ex vivo* model of first trimester placental histoculture, suggesting a putative role for viral dissemination [36]. In the present study, we used immortalized cytotrophoblasts derived from first trimester placenta [37] to comprehensively examine the consequences of hCMV infection on sEVs. We show that hCMV increases the sEV production by cytotrophoblasts and alters their protein content towards a proviral phenotype. Finally, we observe that sEVs secreted by hCMV-infected cytotrophoblasts potentiate infection in naive recipient cells, including neural stem cells. Importantly, this enhancement of hCMV infection is also observed both with sEVs prepared from *ex vivo* early placental histocultures and with

sEVs purified from amniotic fluid of patient infected by hCMV during first trimester of pregnancy. Our study provides evidence suggesting that placental sEVs could be key players favoring viral dissemination towards fetal brain during hCMV congenital infection.

MATERIALS AND METHODS

Human ethic approval

The use of neural stem cells (NSCs) from human embryonic stem cells was approved by the French authorities (Agence de la Biomédecine, authorization number SASB0920178S).

For the use of human samples and their associated data, the biological resource center Germethèque (BB-0033-00081; declaration: DC-2014-2202; authorization: AC-2015-2350) obtained the written consent from each patient (CPP.2.15.27). For first trimester placenta explants, the steering committee of Germethèque gave its approval for the realization of this study on Feb 5th, 2019. The hosting request made to Germethèque bears the number 20190201 and its contract is referenced under the number 19 155C. For amniotic fluid, approval was obtained on July 12th, 2019, the hosting request bears the number 20190606 and the contract is referenced under the number DIR-20190823022.

Cell lines

MRC5 cells (RD-Biotech), human fetal pulmonary fibroblasts permissive for hCMV, were cultured in Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM with Glutamax, Gibco) in the presence of 10% fetal bovine serum (FBS, Sigma-Aldrich), 100 U/ml penicillin - 100 µg/ml streptomycin (Gibco) and 100 µg/ml normocin (Invivogen).

Extravillous cytotrophoblasts (HIPEC) were obtained from Dr T. Fournier (Inserm, Paris; Transfer agreement n°170448). They were cultured in DMEM / F12 medium (Gibco) at 50/50 ratio (v/v), with the same supplementation as MCR5. To purify sEVs from cytotrophoblasts, culture medium was previously depleted from EVs to obtain "Exofree" medium. To this aim, DMEM supplemented with 20 % FBS was ultracentrifuged at 100,000 g for 16 hours at 4 °C (rotor SW32Ti, with maximal acceleration and brake) and filtered at 0.22 μ m. Exofree medium was then obtained by a 1:1 dilution with F12 to reach 10 % FBS, with addition of antibiotics as previously described.

NSCs were obtained from Dr A. Benchoua (I-Stem, Evry, France). NSC lineage was produced from ES human cells (SA001, I-STEM, UMR861 France) [38] and were maintained in growth medium consisting of DMEM / F12 / Neurobasal medium (Gibco) mixed at a ratio of 1/1/2 (v/v/v) in the presence of N2 (50 μ L/mL) and B27 without vitamin A supplements (Gibco), 10 ng/ml FGF2 (Fibroblast Growth Factor), 10 ng/ml EGF (Epidermal Growth Factor), 20 ng/ml BDNF (Brain-Derived Neurotrophic Factor; all from Peprotech). Beforehand, culture supports were coated by PBS containing poly-L-ornithine (3,3 μ g/cm²; Sigma) then by PBS containing mouse laminin (1 μ g/cm²; Roche), each step followed by extensive washes. Stem character of NSCs was systematically assessed by immunofluorescence against Nestin and SOX2 proteins (data not shown).

Cell cultures were checked for the absence of mycoplasma (Plasmotest, Invivogen, Toulouse, France).

Virus production, titration and infection

The endotheliotropic VHL/E strain of hCMV - a gift from Dr C. Sinzger, University of Ulm, Germany - was used in this study [39]. Viral stocks were obtained upon amplification of the virus on MRC5 cells and concentrated by ultracentrifugation, as already described [14]. Virus titration was realized by indirect immunofluorescence against the Immediate Early (IE) antigen of hCMV, upon infection of MRC5 cells by serial dilutions of the viral stock [14]. In some experiments, virus titration was also performed by qPCR from cell culture supernatants [40].

To purify sEVs from infected cells, 4 million cytotrophoblasts were seeded in 150 cm² flask, with 6 flasks per condition. 24 h later, cells were infected or not by hCMV at multiplicity of infection (MOI) of 10 (Supplementary Figure 1A). Culture medium was replaced by Exofree medium 24 h post-infection, after having previously ensured that this did not affect the cell growth (Supplementary Figure 1B). Culture supernatants were collected at 48 h and 72 h post-infection, times at which 50-80 % of cells were infected as assessed by IE immunofluorescence (Supplementary Figure 1C). Medium were pooled for each condition (non-infected or infected) and submitted to sEV preparation protocol. Cell number at the end of the experiment was determined by counting upon trypsinization and cell viability evaluated by trypan blue.

sEV preparation

Procedures were realized as described previously [36], according to ISEV guidelines [41]. All steps were performed at 4 °C and PBS solution was filtered on a 0.22 \Box m filter. A preclearing centrifugation of the conditioned medium was carried out for 30 min at 1,200 g to eliminate dead cells and large debris, followed by a second ultracentrifugation for 30 min at 12,000 g (rotor SW32Ti, with maximal acceleration and brake) to eliminate large EVs (principally microvesicles) and the majority of viruses. A last ultracentrifugation was done for 1 hour at 100,000 g (Rotor SW32Ti, with maximal acceleration and brake) allowing to pellet sEVs. The pellet was resuspended either in 100 µl PBS or in diluent C (Sigma) for PKH67 staining of the vesicles (Sigma), according to the manufacturer's instructions (5 min incubation; 1:1,000 dilution). Pellet was diluted in a solution of 40 % iodixanol in sucrose before ultracentrifugation on a discontinuous iodixanol/sucrose gradient (10 to 40 % iodixanol) with deposition of the sEVs on the bottom of the tube, during 18 h at 100,000 g (rotor SW41Ti, acceleration 5, no brake), to separate sEV from remaining viruses [34, 36, 42]. Six fractions of 1.7 ml were collected, fractions 2+3 were pooled and washed in 25 ml PBS. After a last ultracentrifugation for 1 h at 100,000 g (Rotor SW32Ti, with maximal acceleration and brake), the sEV pellet was resuspended in PBS, aliquoted and stored at -80 °C. We submitted all relevant data to the EV-TRACK knowledgebase (EV-TRACK ID: EV210154) and obtained an EV-METRIC score of 100 % for trophoblast and placental explants EVs [43].

Nanoparticle tracking analysis (NTA)

sEV preparations were diluted 1:100 in filtered PBS (0.22 μ m) and tracked using a NanoSight LM10 (Malvern Panalytical) equipped with a 405 nm laser. Videos were recorded three times for each sample at constant temperature (22 °C) during 60 s and analyzed with NTA Software 2.0 (Malvern instruments Ltd). Data were analyzed with Excel and GraphPad Prism (v8) softwares.

Transmission electron microscopy and immunolabeling electron microscopy

Procedures were performed essentially as described [36, 44, 45]. sEV preparations were loaded on copper formvar/carbon coated grids (Ted Pella) and fixed with 2 % paraformaldehyde in 0.1 M phosphate buffer (pH 7.4). For immunolabeling electron microscopy (IEM), immunodetection was carried out with the following primary antibodies: mouse anti-human CD63 (Abcam ab23792), mouse anti-human CD9 or mouse anti-human CD81 (both from Dr E. Rubinstein, Université Paris-Sud, Institut André Lwoff, Villejuif, France). Secondary incubation was performed with a rabbit anti mouse Fc fragment (Dako Agilent Z0412), then grids were incubated with Protein A-Gold 10 nm (Cell Microscopy Center, Department of Cell Biology, Utrecht University). Finally, a second fixation step with 1 % glutaraldehyde in PBS was performed and samples were stained with 4 % uranyl acetate in methylcellulose. All samples were observed with a Tecnai Spirit electron microscope (FEI, Eindhoven, The Netherlands), and digital acquisitions were made with a numeric 4k CCD camera (Quemesa, Olympus, Münster, Germany). Images were analysed with iTEM software (EMSIS) and statistical studies were done with GraphPad Prism software (v8).

Multiplex bead-based flow cytometry assay

Bead-based multiplex analysis using the MACSPlex Exosome Kit, human (Miltenyi Biotec) were realized on sEV preparations by flow cytometry according to the manufacturer's instructions [46, 47], and as described previously [36]. This allowed the quantification of 39 different EV markers, distinguishable by flow cytometry by a specific PE and FITC labeling. The MACSQuant Analyzer 10 flow cytometer (Miltenyi Biotec) was used for analysis. The tool MACSQuantify was used to analyze data (v2.11.1746.19438). GraphPad Prism (v8) software was used to perform statistical analysis of the data.

Western blot

sEV samples were lysed in non-reducing conditions in Laemmli buffer, heated for 5 min at 95 °C, and loaded on mini protean TGX precast 4-20 % gradient gels (Biorad) in Tris-glycine buffer. Electrophoresis was performed at 110 V for 2 h, then proteins were electro-transferred onto nitrocellulose membranes using the trans-blot turbo transfer system (Biorad). Membranes were blocked with Odyssey blocking buffer (Li-Cor Biosciences) for 1 h, then incubated with different primary antibodies: mouse anti-CD81 (200 ng/ml, Santa-Cruz), mouse anti-CD63 (500 ng/ml, BD Pharmingen), mouse anti-CD9 (100 ng/ml, Millipore), rabbit anti-Tsg101 (1 μ g/ml, Abcam), rabbit anti-Alix (1 μ g/ml, Abcam), mouse anti-Thy1 (0.5 μ g/ml, Biolegend), rabbit anti-Tom20 (1/500, Sigma) or goat anti-Calnexin (2 μ g/ml, Abcam) overnight at 4 °C in

Odyssey blocking buffer, followed by incubation with the secondary antibody IRDye 700 antimouse IgG or IRDye 800 anti-rabbit or anti-goat IgG (Li-Cor Biosciences) for 1 h at room temperature. Membranes were washed three times in TBS 0.1 % Tween 20 during 10 min after each incubation step and visualized using the Odyssey Infrared Imaging System (LI-COR Biosciences).

Quantitative proteomic analysis

Sample preparation

Protein samples in Laemmli buffer (3 biological replicates of sEVs preparation from noninfected and hCMV-infected cytotrophoblasts cells) were submitted to reduction and alkylation (30 mM DTT and 90 mM iodoacetamide, respectively). Protein samples were digested with trypsin on S-trap Micro devices (Protifi) according to manufacturer's protocol, with the following modifications: precipitation was performed using 545 μ l S-Trap buffer and 1 μ g Trypsin was added per sample for digestion.

NanoLC-MS/MS analysis

Peptides were analyzed by nanoLC-MS/MS using an UltiMate 3000 RSLCnano system coupled to a Q-Exactive-Plus mass spectrometer (Thermo Fisher Scientific, Bremen, Germany). Five μ L of each sample were loaded on a C-18 precolumn (300 μ m ID x 5 mm, Dionex) in a solvent made of 5 % acetonitrile and 0.05 % TFA and at a flow rate of 20 μ L/min. After 5 min of desalting, the precolumn was switched online with the analytical C-18 column (75 μ m ID x 15 cm, Reprosil C18) equilibrated in 95 % solvent A (5 % acetonitrile, 0.2 % formic acid) and 5 % solvent B (80 % acetonitrile, 0.2 % formic acid). Peptides were eluted using a 5 to 50 % gradient of solvent B over 105 min at a flow rate of 300 nL/min. The Q-Exactive-Plus was operated in a data-dependent acquisition mode with the XCalibur software. Survey scan MS were acquired in the Orbitrap on the 350-1500 m/z range with the resolution set to a value of 70000. The 10 most intense ions per survey scan were selected for HCD fragmentation. Dynamic exclusion was employed within 30 s to prevent repetitive selection of the same peptide. At least 3 injections were performed for each sample.

Bioinformatics data analysis of mass spectrometry raw files

Raw MS files were processed with the Mascot software for database search and with Proline [48] for label-free quantitative analysis. Data were searched against *Human herpesvirus* 5 and

Human entries of the UniProtKB protein database (Human betaherpesvirus 5 clone VHL-E-BAC19 and release Uniprot Swiss-Prot February 2018). Carbamidomethylation of cysteines was set as a fixed modification, whereas oxidation of methionine was set as variable modification. Specificity of trypsin/P digestion was set for cleavage after K or R, and two missed trypsin cleavage sites were allowed. The mass tolerance was set to 10 ppm for the precursor and to 20 mmu in tandem MS mode. Minimum peptide length was set to 7 amino acids, and identification results were further validated in Proline by the target decoy approach using a reverse database at both a PSM and protein false-discovery rate of 1%. After mean of replicate injections, the abundance values were log2 transformed and missing values were replaced by random numbers drawn from a normal distribution with a width of 0.3 and down shift of 1.8 using the Perseus toolbox (version 1.6.7.0). For statistical analysis, a Student *t*-test (two-tailed *t*-test, equal variances) was then performed on log2 transformed values to analyse differences in protein abundances in all biologic group comparisons. Significance level was set at p = 0.05, and log2 ratios were considered relevant if higher than 1 or lower than -1. The mass spectrometry proteomics data have been deposited to the ProteomeXchange Consortium via the PRIDE [49] partner repository with the dataset identifier PXD029146.

Functional proteomic data analysis

Volcano plot was established for proteins whose mean abundance exhibited a log2 ratio higher than 1 or lower than -1 and when Student's *t*-test *p*-values were ≤ 0.05 between the infected and the non-infected conditions. The list of human proteins exhibiting a normalized mean protein abundance log2 ratio > 1 or < -1 between sEVs from non-infected or hCMV-infected samples was used as an input for analysis with QIAGEN Ingenuity Pathway Analysis (IPA) [50]. Results from IPA biological functions and diseases analysis were filtered to retrieve annotations having an absolute activation z-score > 1 and defined by less than 150 molecules. The resulting annotations were manually curated to remove redundant annotations sharing identical genes, keeping annotations defined by the greater number of molecules.

Flow cytometry analysis

After incubation of cells with PKH67-stained sEVs, cells were washed twice with PBS and trypsinized, before proceeding to flow cytometry analysis. PKH67 positive cells were analyzed

on a Macsquant VYB Flow Cytometer (Miltenyi Biotec), by using FCS and FITC fluorescence parameters, and by subtracting cell autofluorescence background. Data were analyzed with FlowJo (BD) and GraphPad Prism (v8) software.

Immunofluorescence

Cells were fixed using 4 % PFA (Electron microscopy Sciences) at room temperature for 20 min, followed by PBS wash. Permeabilization was then performed with PBS 0,3 % Triton-X100 (Thermofisher scientific) for 10 min at room temperature, followed by 1 h incubation in blocking buffer (PBS with 5 % FBS). Incubation with primary antibodies diluted in blocking buffer was carried out overnight at 4 °C, against hCMV immediate early protein 1 and 2 (1 μ g/ml; Abcam IE1/IE2 CH160 ab53495), nestin (4 μ g/ml; Abcam 10C2 ab 22035), or SOX2 (1/500 of stock; Cell Signaling D6D9 #3579). Secondary antibody incubation (Goat anti mouse or rabbit - Alexa-fluor 488 or 594 (2 μ g/ml; Thermo Fischer Scientific)) was performed at room temperature for 1 h. For actin staining, Alexa-fluor 568 phalloidin (5 μ g/ml; Thermo Fischer Scientific A12380) was incubated on cells overnight at 4°C. DAPI staining (1 μ g/ml; Sigma) was performed for 10 min at room temperature. ProLong Gold without DAPI (Thermo Fischer Scientific) was used for coverslip mounting.

Widefield acquisitions were realized using Apotome microscope (Zeiss) and confocal acquisitions were made on SP8-STED microscope (Leica). Image processing was performed using ImageJ. GraphPad Prism (v8) software was used to perform data statistical analysis.

Placental histoculture

Placental histocultures were carried out as described [36, 51]on first trimester placentas (4 placentas; mean = 13.11 ± 0.49 (SEM) weeks of amenorrhea, *i.e.*, 11.11 ± 0.49 weeks of pregnancy; age of the women: mean = 23 ± 1.5 (SEM) year-old), following elective abortion by surgical aspiration at Paule de Viguier Maternity Hospital (Toulouse, France). Briefly, trophoblastic villi were manually dissected in small explants (2-3 mm³), washed in PBS, and kept overnight in Exofree medium to eliminate the remaining red blood cells. To infect placental explants by hCMV, an overnight incubation of half of the explants was performed upon dissection with 500 \Box 1 of pure viral stock (corresponding to around 10^8 focus forming units, ffu) mixed with 500 \Box 1 of Exofree medium. Explants were then washed in PBS and

deposited nine by nine on gelatin sponges (Gelfoam, Pfizer) in a 6-well plate containing 3 ml of Exofree medium, in at least 6 wells per condition (non-infected *versus* infected). Conditioned medium was collected and renewed with fresh Exofree medium every 3 to 4 days for the duration of the culture. At 14 days of culture, total collected medium was pooled for each condition and used to perform sEV preparation as described above. Placental explants were weighed for normalization of resuspension volume and calculation of sEV yield.

Amniotic fluid collection

Remaining amniotic fluid (AF) collected during classic patient care was saved for the present study. It was subjected to a 10 min centrifugation at 3000 rpm in order to remove the cells and large debris before its storage at -80 °C. The sEV preparation was carried out according to the procedure described above.

RESULTS

Cytotrophoblast infection by hCMV leads to an increase of sEV secretion

To study the consequences of hCMV infection on placental sEV secretion and composition in early pregnancy, we used an immortalized cell line derived from first trimester extravillous cytotrophoblasts (HIPEC [37, 52]), for which the expression of the cytokeratin 7 specific cytotrophoblastic marker was verified (data not shown). Cell supernatants were collected and pooled upon 48-72 h of infection before sEV preparation. To exclude any possible effect of viral contamination of sEV preparations in further experiments, an infectivity test was systematically carried out at the end of the sEV preparations (Supplementary Figure 1A). When sEV isolated from infected or non-infected cytotrophoblasts were incubated with MRC5 cells, no infection was detected either by immunofluorescence done against IE, nor by RT-qPCR against the viral mRNA encoding UL55 protein (Figure 1A). In contrast, cells incubated with hCMV at a MOI of 3 showed active viral replication. Moreover, no structure evoking hCMV viral particle was observed on sEVs isolated from infected cells by TEM (Supplementary Figure 2 and data not shown).

Counting of infected cytotrophoblasts at the time of sEV preparation procedure showed a significant decrease of cell number upon hCMV infection compared to non-infected cells (Supplementary Figure 1D) with, however, no overt cell mortality assessed by trypan blue staining (data not shown). Despite the lower cell number upon infection, the quantification of sEVs isolated per cell showed a significant higher yield of production by hCMV-infected cytotrophoblasts compared to non-infected cytotrophoblasts, with an increase of around 40 % upon infection (Figure 1B). However, no difference in either the mean size or the mode size of the sEV preparations was observed upon infection when analyzed by NTA (Figure 1C) and vesicles deriving for both non-infected or infected cytotrophoblasts exhibited the typical structure and shape of sEVs as evidenced by TEM (Figure 1D and Supplementary Figure 2). Relative size distribution was next determined by TEM, by evaluating the relative size of sEV on three independent preparations and for at least 1100 sEV per condition (Figure 1E and F). By using this approach, a significant change in relative size distribution and a global decrease of sEV relative size was observed upon hCMV infection. Indeed, relative size of sEV produced from non-infected cytotrophoblasts was 110 nm and decreased to 97 nm for sEV deriving from hCMV-infected cytotrophoblasts.


Figure 1: Impact of hCMV on trophoblastic cells sEV production, size and ultrastructure. A) Immunofluorescence realized against hCMV Immediate Early (IE) antigen in non-treated MRC5 cells (panel a), or upon incubation during 24 h with either hCMV at MOI 3 (panel b), sEVs isolated from non-infected (panel c) or from hCMV-infected cytotrophoblasts (panel d). Magnification = 20 x. Blue (upper panel): DAPI; red (lower panel): IE. Below images are indicated the results of RT-qPCR realized against hCMV UL55 mRNAs on RNA extracted from MRC5 cells at 48 h post-incubation with hCMV or sEV preparations (+: amplification; -: no amplification). Data are representative for at least three independent experiments. B) Yield of sEV recovered upon sEV preparation from non-infected (NI) or infected (hCMV) cytotrophoblasts, calculated upon NTA experiments. *, p = 0.0464 by paired *t*-test for 7 independent experiments. C) Comparison of mean size (left histogram) and mode size (right histogram) between sEVs prepared from non-infected (NI) or infected (hCMV) cytotrophoblasts, calculated upon NTA experiments. Histograms show the mean ± SEM of three independent experiments. ns: non-significant by Mann Whitney test. D) Electron microscopy images of sEV (indicated by an arrow) prepared from non-infected (NI) or infected (hCMV) cytotrophoblasts. Magnification = 26000 X. Scale bar = 100 nm. Images are representative of at least three independent experiments. E) Distribution analysis of sEV relative size measured from MET pictures, for sEV isolated from either non-infected (white bars) or infected cytotrophoblasts (grey bars). Each bar of the histogram represents the mean \pm SEM of the number of sEVs per bin (bin width = 20 nm) for three independent experiments. ****, *p* <0.0001 by Chi-square test. F) Relative size of individual sEVs, measured from MET pictures for three independent experiments, was reported on graph, as well as the mean \pm SEM. Total sEV count was 1165 for NI and 1351 for hCMV sEVs. ****, p <0.0001 by Mann-Whitney test.

Impact of hCMV infection on canonical sEV markers

To assess the impact of hCMV infection on the expression of sEV canonical markers, different analyses were carried out. By combining western-blotting, multiplex bead-based flow cytometry and immunolabeling electron microscopy, we observed that sEVs preparations expressed specific vesicular markers including CD9, CD81, Alix and Tsg101, without contamination by any endoplasmic reticulum or mitochondrial marker (Figure 2), confirming the quality of the sEV isolation procedure [41]. No drastic differences were observed in their expression between sEVs isolated from non-infected or infected cytotrophoblasts (Figure 2).

A multiplex bead-based flow cytometry assay, realized against a panel of proteins [46, 47], indicated that surface proteins expressed by cytotrophoblasts were highly represented on isolated sEVs, like CD24 (a mucin-like glycoprotein expressed by the cytotrophoblasts from the first trimester of pregnancy [53]), CD41b (also known as Integrin alpha 2b, implicated in adhesion and migration of cytotrophoblasts [54]), CD49 (Integrin alpha 5, [55]), CD133 (also called Prominin-1, a pentaspan membrane protein [56]) and SSEA-4 (a stemness marker also expressed by cytotrophoblasts [24]). No significant difference in their surface expression level

was observed between sEV isolated from non-infected or hCMV-infected cytotrophoblasts (Figure 2B).

In contrast, a striking difference of the expression of the vesicular canonical marker CD63 tetraspanin was evidenced by western-blot. The protein was not detected in whole cell lysates, but was enriched in sEVs isolated specifically from hCMV-infected cytotrophoblasts (Figure 2A). By examining CD63 expression at the level of individual vesicles by IEM, we noticed that this increase was correlated to the presence of a small proportion of sEVs highly positive for CD63 (between 1-5 %, Supplementary Figure 3), while the others remained negative (Figure 2E). By multiplex bead-based flow cytometry assay, no significant difference in CD63 expression could be detected between sEVs prepared from non-infected or infected cytotrophoblasts, certainly due to the low proportion of positive vesicles (Figure 2B). These data revealed that hCMV infection did not globally impact on canonical markers of sEV secreted from cytotrophoblasts, except for CD63 which appeared in a subpopulation of vesicles upon infection.



Figure 2: Impact of hCMV infection of trophoblastic cells on sEV canonical markers. A) Western-blot realized on either whole cell lysates (left wells) or purified sEVs (right wells), from non-infected (NI) or infected (hCMV) cytotrophoblasts. Proteins of interest and their corresponding molecular weight are indicated on the right of the Figure, with a smear for CD63 due to the non-reducing conditions of the western blot, which preserve its rich glycosylated pattern. B) Surface expression level of different proteins found on sEV isolated from noninfected (NI) or infected (hCMV) cytotrophoblasts, determined with the multiplex flow cytometry MACSPlex exosome kit assay. The heat-map represents the mean of 3 independent experiments, for different sEV markers indicated on the left column. Blue intensity is proportional to the level of expression calculated in Median Fluorescence Intensity, indicated on the right of the heat-map. ns, non-significant by two-way ANOVA. C-E) TEM observation of sEV - isolated from non-infected (NI) or infected (hCMV) cytotrophoblasts - which were immunogold-labelled for CD9 (C), CD81 (D) or CD63 (E), and revealed with Protein A-gold particle of 10 nm diameter. Scale bar = 100 nm. Magnification = 26000 X. In E) only positive vesicles, representing around 1-5 % of sEVs isolated upon infection, are shown, the other being negative (see Supplementary Figure 3 for wide field image).

sEVs secreted by infected cytotrophoblasts harbor a proviral protein cargo

To go deeper inside the study of the impact of hCMV infection of trophoblastic cells on sEV cargo, a comprehensive proteomic analysis of sEV composition upon infection was carried out. To this end, equivalent amounts of sEVs prepared from non-infected or hCMV-infected cytotrophoblasts were analyzed by mass spectrometry-based quantitative proteomics for three independent sEV preparations. Each sEV preparation was analyzed with at least three technical replicates, leading to the identification of 1,700 to 1,980 proteins per injection and of 3079 proteins across all samples (3048 human and 31 viral; see Supplementary Table 1 for the list of the proteins identified for the three biological replicates). Among the 3048 human proteins identified, the gProfiler2 R package was able to interrogate 2936 proteins, for which the term "extracellular exosome" (Gene ontology GO:0070062) appeared as the most significantly enriched (false discovery rate (FDR) = 1.087859e-²⁵⁹, R package gProfiler2 [57]), with 962 of them (32.8 %) associated with the "extracellular exosome" GO term. Conversely, these 962 proteins constituted 44.1 % of the proteins which define the GO term, and the 94 of the top 100 most frequently identified exosomal proteins, as defined by the Exocarta database (http://exocarta.org/exosome_markers_new), were detected in the sEV preparations.

Mass spectrometry-based quantitative proteomics data indicated that 37 proteins, including 25 viral proteins, were significantly over-represented and 15 human proteins underrepresented in sEVs secreted by cytotrophoblasts upon hCMV infection, as illustrated in the Volcano plot (Figure 3A). Interestingly, the Thy-1 cellular protein, which has been demonstrated to play an important role to facilitate hCMV entry into cells via macropinocytosis [58, 59], was found significantly enriched in sEVs upon infection (Figure 3A and Supplementary Table 1). This was confirmed by western-blot, showing that Thy-1 was detected in sEVs only upon hCMV infection (Supplementary Figure 4A). By using Ingenuity Pathway Analysis (IPA) tool on proteomic data, several biological functions were found to be significantly over- or under-represented in sEVs upon infection (Figure 3B). The highest modulated pathway identified was "autophagy", with several actors showing modified expression in sEVs issued from infected cells, leading to a global autophagy activation pattern (Figure 3C). As EV composition mainly reflects the composition of their secretory cells, this may also reflect the activation of the autophagy pathway induced upon hCMV infection of host cell at the very early times of infection [60-62]. On the other side, two pathways linked to mitochondrial functions (i.e., "consumption of oxygen" and "synthesis of ATP") were found lowered in sEVs prepared from hCMV-infected cells in comparison with non-infected cells (Figure 3B). This also may be the consequence of hCMV-induced mitochondrial dysfunctions [63-66], notably via interference with the antiviral Viperin protein, which leads to decreased cellular ATP levels [67].

Amongst the proteins identified in sEVs isolated from infected cytotrophoblasts, 31 were of viral origin. They are listed in Figure 3D in regards of their biological function, curated from the literature (Supplementary Table 2). They play a role in different aspects of hCMV infection, from viral entry to egress, quiescence, as well as pathogenicity and immune evasion, and are mainly immediate early or late proteins (Supplementary Figure 4B). Interestingly, although sEV preparations were devoid of viral particles as assessed by infectivity assays and TEM, some of the viral proteins found in sEV isolated from hCMV-infected cytotrophoblasts are structural proteins (Figure 3D and Supplementary Table 2), like the envelope proteins gB, gH and gM. Most of the other proteins identified were capsid and tegument proteins that are delivered to host cell upon infection, or proteins immediately expressed after virus entry like IE1 and IE2, which play a role in early transcriptions. Finally, IRS1 and TRS1, which inhibit the establishment of an antiviral state in infected cells, notably by antagonizing the autophagy pathway induced upon hCMV infection [60, 61], were also detected in sEVs isolated from infected cytotrophoblasts. Altogether, analysis of the proteomic data suggested that sEVs secreted by infected cytotrophoblasts may transport a protein cargo with proviral properties, by providing the recipient cells with elements that may facilitate the early steps of a further hCMV infection.



Figure 3: Proteomic analysis of sEV composition upon infection of trophoblastic cells by hCMV. A) Volcano-plot representing differences in normalized mean protein abundance in sEVs hCMV *versus* sEVs NI. Human and viral proteins exhibiting significant differences between the two conditions are represented by circles and triangles, respectively (Student T-test *p*-value <=0.05 and log2 ratio >=1 or <=-1). Red: over- represented proteins; Blue: underrepresented proteins. B) Dot plot representation of the top diseases and biological functions associated with human proteins exhibiting an absolute normalized mean abundance log2 ratio

greater than 1 or lower than -1, in sEVs hCMV *versus* sEVs NI. Top diseases and biological functions associated with changes in the protein content of sEVs upon hCMV-infection were identified using QIAGEN Ingenuity Pathway Analysis (IPA). Size of the circles depends on the number of the proteins identified in the corresponding pathway; level of blue intensity depends on the *p*-value. C) Human proteins associated with the predicted increased activation state of autophagy pathway as determined by IPA. D) Heatmap representation of the biological functions associated with hCMV viral proteins expressed in sEVs hCMV.

sEVs are efficiently uptaken by recipient cells

We next examined whether MRC5 cells may uptake sEVs. To this end, PKH67-stained sEVs prepared from non-infected or infected cytotrophoblasts were incubated with MRC5 cells during various times. By performing fluorescence observations of MRC5 cells incubated with PKH67-stained sEVs during 16 h, a vast proportion of cells showed green puncta into their cytoplasm, indicating an important uptake of sEVs (Figure 4A). When performed as soon as 2 h post-incubation, most of the MRC5 cells already showed numerous cytoplasmic puncta, indicating that sEV uptake already occurred at early time points upon sEV incubation with cells, for both sEVs produced by non-infected and infected cytotrophoblasts (Supplementary Figure 5). Moreover, these puncta were visible on the same confocal plan as actin (revealed by phalloidin staining), indicating an intracytoplasmic localization of PKH67 fluorescence, and not a simple binding of sEVs to the cell surface (Figure 4A and Supplementary Figures 5B and C).

To measure the level of sEV internalization, fluorescence acquisition by recipient cells was then followed by flow cytometry (Figures 4B and C). Percentage of PKH67-positive cells, calculated upon subtraction of cell autofluorescence background, was then calculated depending on duration of incubation with sEVs. As observed in Figures 4B and C, sEV uptake by MRC5 cells was visible as soon as 2 h post-incubation, and reached a maximum of around 13 % of positive cells at 16 h, which remained the same until 24 h. However, this percentage may be somewhat underestimated, since subtraction of cell autofluorescence is faint, given the small size of the vesicles and thus, the small number of PKH67 molecules incorporated. Altogether, these data indicate that the sEVs secreted by cytotrophoblasts are largely uptaken by recipient cells, where they may thereafter exert a biological function.



Figure 4: Internalization of sEVs isolated from non-infected cytotrophoblasts in fetal MRC5 cells. A) Confocal images of fluorescence microscopy carried out on MRC5 cells after 16h incubation with PKH67-labelled sEVs. Blue: DAPI; Red: Phalloidin; Green: PKH67. Scale bar: 100 \Box m. Magnification = 63 X. B) Histogram representing the percentage of PKH67 positive cells along time, upon incubation of MRC5 cells with sEVs. Bars represent the mean \pm SEM of three independent experiments. C) Monitoring of PKH67-labeled sEVs internalization by MRC5 cells by flow cytometry. Dot plots represent MRC5 cell fluorescence upon incubation with PKH67-stained sEVs (200 sEVs/cell) for cells that have not been incubated with sEVs (NT, non-treated), or upon 2 h or 16 h of incubation. X-axis: PKH-67 fluorescence intensity; Y-axis: FSC. Gate indicates cells positive for PKH67.

sEVs from hCMV-infected cytotrophoblasts potentialize further infection of recipient MRC5 cells

Since proteomic data suggested a proviral activity for sEVs issued from infected cytotrophoblasts, we assessed the ability of sEVs to modulate hCMV infection. As sEV cargo was composed of proteins prone to act on early steps of infection - entry and immediate early transcriptions - we reasoned that any putative action of sEVs should take place immediately after delivery of their content into recipient cells. In this regard, different amounts of sEVs from non-infected or hCMV-infected cytotrophoblasts were deposited on MRC5 cells either concomitantly or 2 h before addition of hCMV (Figure 5A). 24 h later, cells were subjected to an anti-IE immunofluorescence (Figure 5B). When added alone, sEVs prepared from hCMVinfected cells did not lead to any detectable expression of IE in MRC5 cells (Figure 5Ba), indicating that they were not contaminated by residual infectious viral particle, as already assessed previously (Figure 1A and Supplementary Figure 2). This also indicated that the detection of IE by immunofluorescence upon infection was due to viral gene expression and not to the presence of IE carried by sEVs, even if it was detected in sEVs secreted by infected cells during proteomic analysis. As observed in Figure 5C, when added simultaneously with hCMV, sEVs did not influence the level of MRC5 cell infection, whatever their origin and quantity, compared to non-treated cells. In contrast, the addition of increasing doses of sEVs prepared from infected cells (sEV hCMV) 2 h before infection led to a potentiation of infection, when compared to cells treated with sEVs prepared from non-infected cells (sEV NI). This increase was significant for the two highest doses of sEVs applied, with a stimulation of infection of around 17 % and 30 % when 50 and 200 sEVs were added per cell, respectively (Figures 5B and D).



Figure 5: Effect of cytotrophoblast sEVs on MRC5 cell permissiveness for hCMV. A) experimental procedure (NT=non-treated). B) Immunofluorescence performed on MRC5 cells against IE viral antigen (blue: DAPI; red: IE). a- Non-infected control cells upon 24 h incubation with sEVs isolated from hCMV-infected cytotrophoblasts. B,c,d- MRC5 cells were either non-treated (b- NT) or incubated during 2 h with sEVs prepared from non-infected (c-sEV NI) or infected cytotrophoblasts (d- sEV hCMV) with 50 sEV per cell, then infected during 24 h with hCMV at a MOI of 0.5 before proceeding to immunofluorescence. Scale bar: 200 \Box m. C-D) MRC5 cells were incubated with sEVs prepared from non-infected (sEV NI) or hCMV-infected (sEV hCMV) cytotrophoblasts and infected by hCMV at a MOI of 0.5, concomitantly (C) or 2 h after sEV incubation (D). Three increasing doses of sEVs were used in these experiments (20, 50 or 200 sEV per cell, from left to right). 24 h later, expression of IE antigen was assessed by immunofluorescence. Quantification of the percentage of IE positive cells was carried out and normalized by the percentage of cells infected by hCMV without any

sEV (NT). Each dot is an independent experiment and corresponds to the mean of the counting of 10 fields, with around 70 cells counted, *i.e.*, around 700 cells per dot. n = 4 to 10 independent experiments. Since sEVs used in infection assays were prepared each time in parallel between non-infected or hCMV-infected cytotrophoblasts from a given batch, statistical analysis was done by pairing the results between sEV NI and sEV hCMV for each independent experiment. ns, non-significant; *, p < 0.05; *** p < 0.001 by paired *t*-test.

sEVs from hCMV-infected cytotrophoblasts, placental tissues and amniotic fluids enhance infection of human neural stem cells

To examine the potential proviral role of placental sEVs on hCMV transmission towards the fetal brain, we performed similar experiments using human NSCs derived from embryonic stem cells [14, 38]. A significant enhancement of hCMV infection was observed when sEVs prepared from infected cytotrophoblasts were used in comparison to sEVs prepared from noninfected cytotrophoblasts (Figure 6A). A mean increase of 42 % was observed when incubation was done during 24 h, but not with shorter incubation times. This delayed timing of incubation needed for observing a proviral action of sEVs may be due to less efficient sEV fixation and/or uptake mechanisms for NSCs in comparison to MRC5 cells.

To get closer to physiological conditions, a model of first trimester placental histocultures was next infected by hCMV and used for sEV isolation. This *ex vivo* model, developed in our team [51, 68], reflects the high complexity of the placental cytoarchitecture. Recent data obtained from this model showed a modification of sEV surface markers upon hCMV infection, which suggested a proviral role of placental sEVs [36]. Similar to what was observed with sEVs from cytotrophoblast origin, sEVs produced by infected placental histocultures significantly potentiated hCMV infection of NSCs in comparison to sEVs secreted by non-infected histocultures, with a mean of 48 % of increase upon 24 h of incubation with sEVs (Figure 6B).



Figure 6: Effect of placental sEVs on neural stem cells permissiveness for hCMV.

NSCs were incubated with sEVs prepared from cytotrophoblasts (A) or *ex vivo* first trimester placental histoculture (B), which were either non-infected (sEV NI) or hCMV-infected (sEV hCMV). 200 sEVs per cell were used. NSCs were then infected by hCMV at a MOI of 3, simultaneously, 2 h, of 24 h after sEV incubation. 24 h later, expression of IE antigen was assessed by immunofluorescence. Quantification of the percentage of IE positive cells was carried out and normalized by the percentage of infection of cells infected by hCMV without any sEV (NT). Each dot is an independent experiment and corresponds to the mean of the counting of 10 fields, with around 70 cells counted, *i.e.* around 700 cells per dot. n = 4 to 7 independent experiments. Since sEVs used in functional assays were prepared each time in parallel between non-infected or hCMV-infected cytotrophoblasts or placental explants from a given batch, statistical analysis was done by pairing the results between sEV NI and sEV hCMV for each independent experiment. ns, non-significant; *, p < 0.05 by paired *t*-test.

Finally, the impact of sEVs prepared from amniotic fluid (AF) obtained from naturally infected pregnant women was assessed (Figure 7). Even if AF sEVs originate from various tissues, an important proportion of them have been described to express placental alkaline phosphatase, testifying of their placental origin [69]. Thus, we reasoned that AF sEVs may also be endowed with a proviral activity and facilitate the infection of NSCs by hCMV. AF was collected at third trimester of pregnancy from 3 women, whose clinical data are summarized in Supplementary Table 3. The first one (NP19) had no history of infection or other maternal disease during pregnancy. The second one (NP6) presented a first trimester hCMV seroconversion with her AF negative for hCMV by qPCR and no fetal defects reported by imaging. The third one (NP12) also seroconverted during first trimester of pregnancy but her AF was positive for hCMV by qPCR and the fetus presented major brain lesions. From the AF of these patients, sEVs were prepared and incubated on NCSs during various times before infection by hCMV. NSCs were subjected to an anti-IE immunofluorescence 24 h later to assess their level of infection. A control experiment verifying that no infectious particle was present in sEVs preparations was systematically performed in parallel (data not shown). Compared to the other sources of sEVs used previously (Figure 6), a significant effect of sEVs on viral infection was observed at earlier times of incubation with NSCs but not at 24 h, certainly due to a difference in sEVs uptake efficiency (Figure 7). When incubation was realized simultaneously or 2 h before hCMV infection, level of infection of NSCs incubated with sEVs prepared from the non-infected patient NP19 or NP6 (infected patient but with AF negative for hCMV) remained similar. Remarkably, when sEVs were prepared from NP12, a case of hCMV positive pregnancy with severe impairment of fetal development, a significant increase of infection of around 20 % was observed in comparison to incubation with sEVs from NP6 or NP19, indicating that NP12 sEVs allowed the enhancement of hCMV infection in recipient NSCs. Hence, our data suggest a correlation between the clinical severity of hCMVcomplicated pregnancy and the proviral effect of sEVs prepared from patient AF.



Figure 7: Effect of sEVs prepared from amniotic fluid of naturally infected pregnant women on neural stem cells permissiveness for hCMV.

NSCs were incubated with sEVs prepared from amniotic fluid (AF) from patient NP19 (noninfected), NP6 (hCMV infected, AF negative for hCMV) or NP12 (hCMV infected, AF positive for hCMV). 200 sEVs per cell were used. NSCs were then infected by hCMV at a MOI of 3, simultaneously, 2 h, of 24 h after sEVs incubation. 24 h later, expression of IE antigen was assessed by immunofluorescence. Quantification of the percentage of IE-positive cells was carried out. Each dot is a biologic replicate and corresponds to the mean of the counting of 10 fields, with around 70 cells counted, *i.e.*, around 700 cells per dot. n = 3 to 4 independent experiments. Results of ordinary one-way ANOVA test performed for the 3 different durations of sEVs incubation are the following: p = 0.0374 (*) for Simultaneously; p = 0.0006 (***) for 2 h before; p = 0.6415 (non-significant) for 24 h before. Histograms represents the mean \pm SEM of the percentage of infected cells in each condition. Statistical comparison between the conditions were done by unpaired *t*-test. ns, non-significant; *, p < 0.05; ** p < 0.005.

DISCUSSION

Although the role of placental sEVs during normal and pathological pregnancy is extensively studied [25, 26, 28, 32, 70], the impact and consequences of hCMV infection on placental sEVs are far to be deciphered, in particular at the beginning of pregnancy. We recently described that infection of first trimester *ex vivo* placental histocultures modified sEV surface markers, suggesting a potential proviral role of the sEVs [36]. However, the difficulty of purifying high sEVs amounts from this model hampered the possibility to conduct a study combining exhaustive analysis of sEV composition and biological function. In this work, we used a combination of a cytotrophoblast cell line deriving from first trimester placenta [37], *ex*

vivo placental histocultures and patient amniotic fluids to isolate sEVs and examine the impact of hCMV infection on their composition and function.

Although a high number of publications describe a role of EVs on pregnancy regulation, the nature of the EVs examined is often not precisely stated, and confusion remains about the subtypes of EVs studied. Here, we decided to focus our study on sEVs, considering the amount of data already available concerning their composition and function [26, 29, 32]. By using the gold-standard method based on differential ultracentrifugation followed by density gradient ultracentrifugation, we were able to isolated sEVs devoid of viral particles in a rigorous manner. These were next further characterized by a combination of complementary approaches and presented the typical features of exosomes in terms of size, structure and presence of canonical markers [41]. Since our work did not focus on their biogenesis pathway, we cannot, however, formally state about their endosomal origin. This is why we used the generic term sEVs along the manuscript, as recommended by the MISEV guidelines. Interestingly, we observed the appearance of a subpopulation of CD63-positive sEVs upon hCMV infection. An enhancement of CD63 expression on sEVs was also recently reported in a study describing a dysregulation of EV biogenesis machinery in a model of hCMV-infected human dermal fibroblasts [71]. Given the low numbers of sEVs positive for CD63 in our model, we have not investigated the underlying molecular mechanism of this CD63 upregulation.

Similar to what has been described in the study using dermal fibroblasts [71], we observed that hCMV infection of our cytotrophoblast cell line increased the yield of sEVs production. However, this increase was counterbalanced by a reduced cell growth upon infection. Hence, the global quantity of sEVs harvested from hCMV- or mock-infected cells remained similar between both conditions. As hCMV mainly replicates in discrete foci in placenta *in vivo* [72], it is unlikely that hCMV infection would impact on the global quantity of sEVs secreted by the placenta.

Our proteomic study on sEVs revealed the presence of viral proteins in the vesicles secreted from infected cells, notably the envelope proteins gB, gH and gM, as it has already been described in other studies [42, 71, 73]. Additionally, many of the identified viral proteins were capsid and tegument proteins that participate to virus particle assembly and release at the end of the replication cycle. They are usually delivered to host cell upon infection by neo-virions or immediately expressed after viral entry process, where they also play crucial roles. Importantly, IE1 and IE2, which are major viral immediate early genes playing a key role in viral genome expression [74-77], were also present in sEVs produced from infected cells. We

also identified pp65, which participates to the transactivation of viral major immediate early genes [78, 79], as well as pp71, which stimulates viral immediate early transcription and inhibits the host innate response by targeting STING [80, 81]. Interestingly, except for pp71, most of the viral proteins identified in our study have not been described in the other previous proteomic studies of sEVs secreted from hCMV-infected cells [73]. Conversely, some viral proteins identified by Turner et al, such as IR11, IRL12, US14, were not found in our study. To reconcile these differences, it is important to keep in mind that our study focused on sEVs secreted by trophoblastic cells between 24 h to 72 h upon infection, *i.e.*, at relatively early time points in replication cycle, when viral particles are only beginning to be released from infected cells. Hence, it is tempting to speculate that sEVs secreted at that early step may prime the neighboring cells for viral dissemination and spread. In contrast, in the study of Turner et al, which was realized in MRC5 cells, sEV protein composition was assessed at 5 days post infection, when large amounts of viral particles are released from cells. Their proteomic study showed a protein cargo more prone to serve immuno-evasion functions at a later timing of infection, by expressing for example the viral Fc-gamma receptor homologue IR11/gp34 [73]. Hence, it seems that composition of sEV secreted by hCMV-infected cells evolves with time, depending on their state of infection and the step of hCMV replication cycle.

In addition to the viral proteins carried by cytotrophoblast sEVs, composition of sEVs for proteins of cellular origin was also altered upon hCMV infection. By using IPA to analyze biological pathway over-represented in sEVs issued from infected cells, the term "autophagy" was the first represented, likely reflecting the autophagy activation induced by hCMV in host cells at the very early times of infection [60-62]. Importantly, TRS1 and IRS1, two viral proteins described to antagonize autophagy at latter time points of the viral cycle [60, 61], were also carried in sEVs, which may consequently inhibit the induction of autophagy in recipient cells upon sEV uptake. One cellular protein, Thy-1, was also found highly over-represented in sEVs from infected cells. Interestingly Thy-1 plays an important role for favoring hCMV entry into cells by macropinocytosis [58, 59]. Hence, all the elements brought by our proteomic analysis of sEVs indicate that they were prone to facilitate viral infection of recipient cells, while inhibiting innate antiviral cellular responses.

By examining the function of sEVs isolated from non-infected or hCMV-infected cytotrophoblasts, we observed that sEVs secreted by infected cells enhanced further hCMV infection of MRC5 cells. Such proviral properties of sEVs produced by infected cells have already been described for other *Herpesviridae* [82, 83] and very recently for hCMV [71] -

although not in a placental context - and confirm a general role of sEVs in modulating viral transmission for many viral families [84-86]. Since placental sEVs are found both in maternal and fetal sides at high quantities as soon as the early beginning of pregnancy [87, 88], we hypothesized that they may facilitate hCMV dissemination not only in the placental tissues but also towards the fetus, notably in the fetal brain, by enhancing hCMV infectivity in fetal neural cells. Indeed, we observed that sEVs prepared from an infected trophoblast cell line or first trimester placental explants enhanced hCMV infection of human NSCs. Finally, our observations were confirmed using clinical samples. Strikingly, a significant enhancement of infection was observed with sEVs isolated from the amniotic fluid of an infected woman (with amniotic fluid positive for hCMV) whose fetus showed severe neurodevelopmental impairments, in contrast to sEVs isolated from the amniotic fluid of a non-infected pregnant woman, or an infected woman (with amniotic fluid negative for hCMV) whose fetus showed no detectable developmental defects. Hence, placental sEVs seem to be key players of hCMV dissemination towards the fetus during congenital infection and may be one of the missing links explaining the variety and severity of sequelae observed during viral congenital infection.

REFERENCES

- Lanzieri, T.M., et al., Seroprevalence of cytomegalovirus among children 1 to 5 years of age in the United States from the National Health and Nutrition Examination Survey of 2011 to 2012. Clin Vaccine Immunol, 2015. 22(2): p. 245-7.
- 2. Cannon, M.J., D.S. Schmid, and T.B. Hyde, *Review of cytomegalovirus seroprevalence and demographic characteristics associated with infection*. Rev Med Virol, 2010. **20**(4): p. 202-13.
- 3. Leruez-Ville, M., et al., *Cytomegalovirus infection during pregnancy: state of the science*. Am J Obstet Gynecol, 2020. **223**(3): p. 330-349.
- 4. Pereira, L., et al., *HCMV persistence in the population: potential transplacental transmission*, in *Human Herpesviruses: Biology, Therapy, and Immunoprophylaxis*, A. Arvin, et al., Editors. 2007: Cambridge.
- 5. Pereira, L., et al., *Congenital cytomegalovirus infection undermines early development and functions of the human placenta*. Placenta, 2017. **59 Suppl 1**: p. S8-S16.
- 6. Fisher, S., et al., *Human cytomegalovirus infection of placental cytotrophoblasts in vitro and in utero: implications for transmission and pathogenesis.* J Virol, 2000. **74**(15): p. 6808-20.
- Pereira, L., et al., *Insights into viral transmission at the uterine-placental interface*. Trends Microbiol, 2005. 13(4): p. 164-74.
- 8. Tabata, T., et al., *Cytotrophoblasts infected with a pathogenic human cytomegalovirus strain dysregulate cell-matrix and cell-cell adhesion molecules: a quantitative analysis.* Placenta, 2007. **28**(5-6): p. 527-37.
- 9. Tabata, T., et al., *Cytomegalovirus impairs cytotrophoblast-induced lymphangiogenesis and vascular remodeling in an in vivo human placentation model.* Am J Pathol, 2012. **181**(5): p. 1540-59.

- Tabata, T., et al., *Persistent Cytomegalovirus Infection in Amniotic Membranes of the Human Placenta*. Am J Pathol, 2016. **186**(11): p. 2970-2986.
- 11. Pereira, L., et al., Intrauterine growth restriction caused by underlying congenital cytomegalovirus infection. J Infect Dis, 2014. **209**(10): p. 1573-84.
- 12. Leruez-Ville, M. and Y. Ville, *Fetal cytomegalovirus infection*. Best Pract Res Clin Obstet Gynaecol, 2017. **38**: p. 97-107.
- 13. Picone, O., et al., *Detailed in utero ultrasound description of 30 cases of congenital cytomegalovirus infection*. Prenat Diagn, 2014. **34**(6): p. 518-24.
- 14. Rolland, M., et al., *PPARgamma Is Activated during Congenital Cytomegalovirus Infection and Inhibits Neuronogenesis from Human Neural Stem Cells.* PLoS Pathog, 2016. **12**(4): p. e1005547.
- Rolland, M., et al., Human cytomegalovirus infection is associated with increased expression of the lissencephaly gene PAFAH1B1 encoding LIS1 in neural stem cells and congenitally infected brains. J Pathol, 2021. 254(1): p. 92-102.
- 16. Sarker, S., et al., *Placenta-derived exosomes continuously increase in maternal circulation over the first trimester of pregnancy*. J Transl Med, 2014. **12**: p. 204.
- 17. Luo, S.S., et al., *Human villous trophoblasts express and secrete placenta-specific microRNAs into maternal circulation via exosomes.* Biol Reprod, 2009. **81**(4): p. 717-29.
- 18. Colombo, M., G. Raposo, and C. Thery, *Biogenesis, secretion, and intercellular interactions of exosomes and other extracellular vesicles.* Annu Rev Cell Dev Biol, 2014. **30**: p. 255-89.
- van Niel, G., G. D'Angelo, and G. Raposo, *Shedding light on the cell biology of extracellular vesicles*. Nat Rev Mol Cell Biol, 2018. 19(4): p. 213-228.
- 20. Kalluri, R. and V.S. LeBleu, *The biology, function, and biomedical applications of exosomes.* Science, 2020. **367**(6478).
- 21. Ishida, Y., et al., *Maternal peripheral blood natural killer cells incorporate placenta-associated microRNAs during pregnancy*. Int J Mol Med, 2015. **35**(6): p. 1511-24.
- 22. Chaiwangyen, W., et al., *MiR-519d-3p in Trophoblastic Cells: Effects, Targets and Transfer to Allogeneic Immune Cells via Extracellular Vesicles.* Int J Mol Sci, 2020. **21**(10).
- 23. Li, H., et al., Internalization of trophoblastic small extracellular vesicles and detection of their miRNA cargo in P-bodies. J Extracell Vesicles, 2020. **9**(1): p. 1812261.
- 24. Salomon, C., et al., *Extravillous trophoblast cells-derived exosomes promote vascular smooth muscle cell migration*. Front Pharmacol, 2014. **5**: p. 175.
- 25. Malnou, E.C., et al., *Imprinted MicroRNA Gene Clusters in the Evolution, Development, and Functions of Mammalian Placenta.* Front Genet, 2019. **9**: p. 706.
- 26. Sadovsky, Y., et al., *Placental small extracellular vesicles: Current questions and investigative opportunities.* Placenta, 2020. **102**: p. 34-38.
- 27. Chiarello, D.I., et al., *Foetoplacental communication via extracellular vesicles in normal pregnancy and preeclampsia.* Mol Aspects Med, 2018. **60**: p. 69-80.
- Mitchell, M.D., et al., *Placental exosomes in normal and complicated pregnancy*. Am J Obstet Gynecol, 2015. 213(4 Suppl): p. S173-81.

- Salomon, C. and G.E. Rice, *Role of Exosomes in Placental Homeostasis and Pregnancy Disorders*. Prog Mol Biol Transl Sci, 2017. 145: p. 163-179.
- 30. Salomon, C., et al., *Exosomal signaling during hypoxia mediates microvascular endothelial cell migration and vasculogenesis.* PLoS One, 2013. **8**(7): p. e68451.
- Salomon, C., et al., Gestational Diabetes Mellitus Is Associated With Changes in the Concentration and Bioactivity of Placenta-Derived Exosomes in Maternal Circulation Across Gestation. Diabetes, 2016.
 65(3): p. 598-609.
- 32. Jin, J. and R. Menon, *Placental exosomes: A proxy to understand pregnancy complications*. Am J Reprod Immunol, 2018. **79**(5): p. e12788.
- Delorme-Axford, E., et al., *Human placental trophoblasts confer viral resistance to recipient cells*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2013. 110(29): p. 12048-53.
- 34. Ouyang, Y., et al., *Isolation of human trophoblastic extracellular vesicles and characterization of their cargo and antiviral activity.* Placenta, 2016. **47**: p. 86-95.
- 35. Bayer, A., et al., *Chromosome 19 microRNAs exert antiviral activity independent from type III interferon signaling*. Placenta, 2018. **61**: p. 33-38.
- 36. Bergamelli, M., et al., Human Cytomegalovirus Infection Changes the Pattern of Surface Markers of Small Extracellular Vesicles Isolated From First Trimester Placental Long-Term Histocultures. Front Cell Dev Biol, 2021. 9: p. 689122.
- 37. Pavan, L., et al., *Human invasive trophoblasts transformed with simian virus 40 provide a new tool to study the role of PPARgamma in cell invasion process.* Carcinogenesis, 2003. **24**(8): p. 1325-36.
- 38. Boissart, C., et al., *miR-125 potentiates early neural specification of human embryonic stem cells*. Development, 2012. **139**(7): p. 1247-57.
- 39. Stegmann, C., et al., *The N Terminus of Human Cytomegalovirus Glycoprotein O Is Important for Binding* to the Cellular Receptor PDGFRalpha. J Virol, 2019. **93**(11).
- 40. Mengelle, C., et al., *Performance of a completely automated system for monitoring CMV DNA in plasma*. J Clin Virol, 2016. **79**: p. 25-31.
- Thery, C., et al., *Minimal information for studies of extracellular vesicles 2018 (MISEV2018): a position statement of the International Society for Extracellular Vesicles and update of the MISEV2014 guidelines.* J Extracell Vesicles, 2018. 7(1): p. 1535750.
- 42. Zicari, S., et al., *Human cytomegalovirus-infected cells release extracellular vesicles that carry viral surface proteins*. Virology, 2018. **524**: p. 97-105.
- 43. Consortium, E.-T., et al., *EV-TRACK: transparent reporting and centralizing knowledge in extracellular vesicle research.* Nat Methods, 2017. **14**(3): p. 228-232.
- 44. Hurbain, I., et al., *Analyzing Lysosome-Related Organelles by Electron Microscopy*. Methods Mol Biol, 2017. **1594**: p. 43-71.
- 45. Raposo, G., et al., *B lymphocytes secrete antigen-presenting vesicles*. J Exp Med, 1996. **183**(3): p. 1161-72.
- 46. Koliha, N., et al., A novel multiplex bead-based platform highlights the diversity of extracellular vesicles.J Extracell Vesicles, 2016. 5: p. 29975.

- Wiklander, O.P.B., et al., Systematic Methodological Evaluation of a Multiplex Bead-Based Flow Cytometry Assay for Detection of Extracellular Vesicle Surface Signatures. Front Immunol, 2018. 9: p. 1326.
- 48. Bouyssie, D., et al., *Proline: an efficient and user-friendly software suite for large-scale proteomics*. Bioinformatics, 2020. **36**(10): p. 3148-3155.
- 49. Perez-Riverol, Y., et al., *The PRIDE database and related tools and resources in 2019: improving support for quantification data.* Nucleic Acids Res, 2019. **47**(D1): p. D442-D450.
- 50. Thomas, S. and D. Bonchev, *A survey of current software for network analysis in molecular biology*. Hum Genomics, 2010. **4**(5): p. 353-60.
- 51. Lopez, H., et al., Novel model of placental tissue explants infected by cytomegalovirus reveals different permissiveness in early and term placentae and inhibition of indoleamine 2,3-dioxygenase activity. Placenta, 2011. **32**(7): p. 522-30.
- 52. Rauwel, B., et al., Activation of peroxisome proliferator-activated receptor gamma by human cytomegalovirus for de novo replication impairs migration and invasiveness of cytotrophoblasts from early placentas. J Virol, 2010. **84**(6): p. 2946-54.
- 53. Sammar, M., et al., *Expression of CD24 and Siglec-10 in first trimester placenta: implications for immune tolerance at the fetal-maternal interface*. Histochem Cell Biol, 2017. **147**(5): p. 565-574.
- 54. Rout, U.K., et al., *Alpha5beta1, alphaVbeta3 and the platelet-associated integrin alphaIIbbeta3 coordinately regulate adhesion and migration of differentiating mouse trophoblast cells.* Dev Biol, 2004.
 268(1): p. 135-51.
- 55. Lee, C.Q., et al., *What Is Trophoblast? A Combination of Criteria Define Human First-Trimester Trophoblast.* Stem Cell Reports, 2016. **6**(2): p. 257-72.
- 56. Potgens, A.J., et al., *Human trophoblast contains an intracellular protein reactive with an antibody against CD133--a novel marker for trophoblast.* Placenta, 2001. **22**(7): p. 639-45.
- 57. Raudvere, U., et al., *g:Profiler: a web server for functional enrichment analysis and conversions of gene lists (2019 update).* Nucleic Acids Res, 2019. **47**(W1): p. W191-W198.
- 58. Li, Q., E. Fischer, and J.I. Cohen, *Cell Surface THY-1 Contributes to Human Cytomegalovirus Entry via a Macropinocytosis-Like Process.* J Virol, 2016. **90**(21): p. 9766-9781.
- 59. Li, Q., et al., *THY-1 Cell Surface Antigen (CD90) Has an Important Role in the Initial Stage of Human Cytomegalovirus Infection.* PLoS Pathog, 2015. **11**(7): p. e1004999.
- 60. Chaumorcel, M., et al., *The human cytomegalovirus protein TRS1 inhibits autophagy via its interaction with Beclin 1.* J Virol, 2012. **86**(5): p. 2571-84.
- 61. Mouna, L., et al., Analysis of the role of autophagy inhibition by two complementary human cytomegalovirus BECN1/Beclin 1-binding proteins. Autophagy, 2016. **12**(2): p. 327-42.
- 62. Taisne, C., et al., *Human cytomegalovirus hijacks the autophagic machinery and LC3 homologs in order* to optimize cytoplasmic envelopment of mature infectious particles. Sci Rep, 2019. **9**(1): p. 4560.
- 63. Karniely, S., et al., *Human Cytomegalovirus Infection Upregulates the Mitochondrial Transcription and Translation Machineries.* mBio, 2016. **7**(2): p. e00029.
- 64. Federspiel, J.D., et al., *Mitochondria and Peroxisome Remodeling across Cytomegalovirus Infection Time Viewed through the Lens of Inter-ViSTA*. Cell Rep, 2020. **32**(4): p. 107943.

- 65. Combs, J.A., et al., *Human Cytomegalovirus Alters Host Cell Mitochondrial Function during Acute Infection.* J Virol, 2020. **94**(2).
- 66. Monk, C.H. and K.J. Zwezdaryk, *Host Mitochondrial Requirements of Cytomegalovirus Replication*. Curr Clin Microbiol Rep, 2020. **7**(4): p. 115-123.
- 67. Seo, J.Y., et al., *Human cytomegalovirus directly induces the antiviral protein viperin to enhance infectivity*. Science, 2011. **332**(6033): p. 1093-7.
- 68. Benard, M., et al., *Human cytomegalovirus infection induces leukotriene B4 and 5-lipoxygenase expression in human placentae and umbilical vein endothelial cells.* Placenta, 2014. **35**(6): p. 345-50.
- 69. Dixon, C.L., et al., *Amniotic Fluid Exosome Proteomic Profile Exhibits Unique Pathways of Term and Preterm Labor.* Endocrinology, 2018. **159**(5): p. 2229-2240.
- 70. Adam, S., et al., *Review: Fetal-maternal communication via extracellular vesicles Implications for complications of pregnancies.* Placenta, 2017. **54**: p. 83-88.
- 71. Streck, N.T., et al., *Human Cytomegalovirus Utilizes Extracellular Vesicles To Enhance Virus Spread*. J Virol, 2020. **94**(16).
- 72. Uenaka, M., et al., *Histopathological analysis of placentas with congenital cytomegalovirus infection*. Placenta, 2019. **75**: p. 62-67.
- 73. Turner, D.L., et al., *The host exosome pathway underpins biogenesis of the human cytomegalovirus virion.* Elife, 2020. **9**.
- 74. Mocarski, E.S., et al., A deletion mutant in the human cytomegalovirus gene encoding IE1(491aa) is replication defective due to a failure in autoregulation. Proc Natl Acad Sci U S A, 1996. 93(21): p. 11321-6.
- 75. Ahn, J.H. and G.S. Hayward, *The major immediate-early proteins IE1 and IE2 of human cytomegalovirus colocalize with and disrupt PML-associated nuclear bodies at very early times in infected permissive cells.* J Virol, 1997. **71**(6): p. 4599-613.
- 76. Nevels, M., C. Paulus, and T. Shenk, *Human cytomegalovirus immediate-early 1 protein facilitates viral replication by antagonizing histone deacetylation*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2004. **101**(49): p. 17234-9.
- 77. Wiebusch, L. and C. Hagemeier, *Human cytomegalovirus 86-kilodalton IE2 protein blocks cell cycle progression in G(1).* J Virol, 1999. **73**(11): p. 9274-83.
- 78. Cristea, I.M., et al., *Human cytomegalovirus pUL83 stimulates activity of the viral immediate-early promoter through its interaction with the cellular IFI16 protein.* J Virol, 2010. **84**(15): p. 7803-14.
- 79. Arcangeletti, M.C., et al., *Cell-cycle-dependent localization of human cytomegalovirus UL83 phosphoprotein in the nucleolus and modulation of viral gene expression in human embryo fibroblasts in vitro.* J Cell Biochem, 2011. **112**(1): p. 307-17.
- 80. Lukashchuk, V., et al., *Human cytomegalovirus protein pp71 displaces the chromatin-associated factor ATRX from nuclear domain 10 at early stages of infection.* J Virol, 2008. **82**(24): p. 12543-54.
- Fu, Y.Z., et al., Human Cytomegalovirus Tegument Protein UL82 Inhibits STING-Mediated Signaling to Evade Antiviral Immunity. Cell Host Microbe, 2017. 21(2): p. 231-243.
- 82. Bello-Morales, R. and J.A. Lopez-Guerrero, *Extracellular Vesicles in Herpes Viral Spread and Immune Evasion*. Front Microbiol, 2018. **9**: p. 2572.

- Cone, A.S., S.B. York, and D.G. Meckes, Jr., *Extracellular Vesicles in Epstein-Barr Virus Pathogenesis*. Curr Clin Microbiol Rep, 2019. 6(3): p. 121-131.
- 84. Lenassi, M., et al., *HIV Nef is secreted in exosomes and triggers apoptosis in bystander CD4+ T cells.* Traffic, 2010. **11**(1): p. 110-22.
- 85. Chapuy-Regaud, S., et al., *Characterization of the lipid envelope of exosome encapsulated HEV particles* protected from the immune response. Biochimie, 2017. **141**: p. 70-79.
- 86. Grunvogel, O., et al., Secretion of Hepatitis C Virus Replication Intermediates Reduces Activation of Toll-Like Receptor 3 in Hepatocytes. Gastroenterology, 2018. **154**(8): p. 2237-2251 e16.
- 87. Liu, H., et al., *Estimation of the burden of human placental micro- and nano-vesicles extruded into the maternal blood from 8 to 12 weeks of gestation.* Placenta, 2018. **72-73**: p. 41-47.
- 88. Miranda, J., et al., *Placental exosomes profile in maternal and fetal circulation in intrauterine growth restriction Liquid biopsies to monitoring fetal growth.* Placenta, 2018. **64**: p. 34-43.

FUNDING

This project has received financial support from the French Biomedicine Agency, institutional grants from Inserm, CNRS and Toulouse 3 University. This project is part of the doctorate thesis of Mathilde Bergamelli, who was funded by the Ministry of Education and Research (MESR). The TEM experiments were performed on PICT-IBiSA, Institut Curie, Paris, member of the France-BioImaging national research infrastructure, and were supported by the French National Research Agency through the "Investments for the Future" program (France-BioImaging, ANR-11-INSB-04), supported by the CelTisPhyBio Labex (N° ANR-11-LB0038) part of the IDEX PSL (N°ANR-10-IDEX-0001-02 PSL). The proteomic part of this project was supported in part by the Région Occitanie, European funds (Fonds Européens de Développement Régional, FEDER), Toulouse Métropole, and by the French Ministry of Research with the Investissement d'Avenir Infrastructures Nationales en Biologie et Santé program (ProFI, Proteomics French Infrastructure project, ANR-10-INBS-08).

CONFLICTS OF INTEREST

The authors declare that the research was conducted in the absence of any commercial or financial relationships that could be construed as a potential conflict of interest.

AUTHOR'S CONTRIBUTION

MBer and HM designed and performed most experiments and analyzed data. JMM and JI were in charge of the viral titrations. MM, OBS and YA performed the proteomic experiments and data analysis. MBén, MG, GC and YTLG collected the clinical samples and data. NM from Germethèque was in charge of the ethical issues and received women authorizations. IH, GDA and GR supervised the electron microscopy experiments and data analysis. TF and AB generated the HIPECs and NSCs respectively, and gave scientific expertise concerning their culture. CEM got grants for this study, conceived and designed the study, analyzed data and wrote the paper, with the help of MBer, YA and OBS. All authors provided critical feedback and helped shape the research, analysis and manuscript.

ACKNOWLEDGMENTS

We greatly thank C. Chouquet, B. Rauwel, M. Mouysset, L. Battut, C. Mengelle, F. Chauvrier, P. Verdy, N. Kopf, as well as the whole ViNeDys team, for their technical assistance and their numerous advice and discussions which allowed the progress of this work. We thank also AL. Iscache, V. Duplan-Eche and F. L'Faqihi-Olive, from the cytometry facility of Infinity, as well as S. Allart and D. Daviaud, from the imaging facility of Infinity, and finally the GeT technical service of Infinity. We thank the medical and paramedical staff of the gynecology unit at Paule de Viguier Hospital, the patients who agreed to participate in the study, as well as L. Bujan and M. Aubry, from the Germethèque. We finally warmly thank E. Haanappel from the Institute of Pharmacology and Structural Biology, who granting us access to the Nanosight device, and Audrey Esclatine and Daniel Gonzalez-Dunia for critical reading of the manuscript and insightful comments.



A) Timeline representing the HIPEC seeding, infection, medium renewal and collection before sEV preparation. D: days; MOI: Multiplicity of infection. B) Comparison of cell growth between complete and Exofree culture medium, by counting of cell number in 12-well plates in which 10^5 cells were initially seeded. Symbols represent mean ± SEM for three independent experiments. A 2-way ANOVA statistical test indicated no significant difference between complete and Exofree medium culture conditions (*p*=0.4414). C) HIPEC are permissive to hCMV infection. Immunofluorescence against Immediate Early (IE) antigen was done on HIPEC either non-infected (NI) or at 48 h or 72 h post-infection (hpi). Green: IE; Blue: DAPI; Magnification: 20 x. D) Total cell number counted at the time of sEV preparation, at 72 hpi, for non-infected (NI) or hCMV infected cells. Results are representative of 15 independent experiments. *p*<0,0001 by paired *t*-test.



TEM micrographs showing sEV from HIPEC either non-infected (NI; upper panel) or infected (hCMV; lower panel). Scale bar: 500 nm.



NI



TEM micrographs showing sEV from HIPEC either non-infected (NI; upper panel) or infected (hCMV; lower panel), after immunogold labelling against CD63. Arrow in the lower panel indicates a CD63 positive sEV. Scale bar: 500 nm.



cells (NI: non-infected). This result is representative of three independent experiments. B) Heat-map representing the different viral protein found in sEV isolated from infected cells, classified depending on their expression timeline during hCMV infection (Immediate early, early or late).

Patient	NP19	NP6	NP12
Age (y)	34	25	31
Time of AF punction (WA)	33	24	31
hCMV seroconversion	No (old immunity)	Yes	Yes
Time of seroconversion (WA)	NA	Between 3-5	<8
PCR hCMV of AF	Negative	Negative	Positive
Log PCR hCMV on AF	NA	NA	8 log
Fetal damage (ultrasound)	Chylothorax Bilateral hydrothorax Idiopathic hydramnios No infectious background or genetic abnormalities detected	20th percentile	Brain damage (periventricular hyperechoic halo, short corpus callosum, occipital horn cyst, germina zone abnormalities) - Intrauterine growth retardation (3rd percentile)
Gestation end	Vaginal delivery at 36 WA	Vaginal delivery at term	Medical abortion at 32 WA

Bergamelli et al, Supplementary Table 3



1.2. Données non publiées et expérimentations en cours

En parallèle de la description protéique exhaustive des sEV trophoblastiques en condition d'infection par le hCMV, nous souhaitons également décrire la composition en miARN de ces sEV, et en particulier les changements potentiels d'expression des miARN du cluster C19MC, fortement exprimé dans le placenta. Pour ce faire, nous avons réalisé des productions de sEV trophoblastiques semblables à celles réalisées pour l'étude protéomique (infectées par le hCMV ou non infectées) et nous en avons extrait les miARN. En collaboration avec le Dr. A. Favereaux et Y. Gassama à l'institut de Broca de Bordeaux, nous avons réalisé des librairies de miARN qui sont actuellement en cours d'analyse bioinformatique. Les données obtenues sur la composition en miARN des sEV trophoblastiques pourraient permettre un niveau de compréhension plus fin des mécanismes pro-viraux décrits dans l'article présenté cidessus. De plus, les miARN présents dans les sEV trophoblastiques en conditions infectée ou non, pourraient constituer des candidats biomarqueurs intéressants dans le cadre du suivi des grossesses hCMV positives.

Afin d'apporter plus de poids à nos données concernant l'impact des sEV trophoblastiques, placentaires et amniotiques sur la biologie des cellules souches neurales humaines, nous avons cherché à mettre au point un modèle de passage des sEV au travers de la barrière hémato-encéphalique. Nous nous intéressons donc spécifiquement au passage des sEV d'origine placentaire au travers de la barrière hémato-encéphalique fœtale. Nous avons choisi d'utiliser un modèle animal de souris nouveau-né afin d'injecter dans le sang périphérique des sEV marquées au PKH67 et de rechercher la présence du marqueur lipidique au niveau cérébral. Comme décrit dans l'introduction, la barrière hémato-encéphalique est à la naissance assez proche de celle retrouvée à l'état fœtal : elle est immature et laisse passer de nombreuses molécules. D'autre part, le système immunitaire des souris nouveau-né est peu fonctionnel, et les sEV d'origine humaine seront donc peu immunogènes pour leurs organismes, comparés à une souris adulte. Si nous injections des sEV à une femelle souris gestante, en cas de résultat négatif, nous n'aurions pas la certitude que les sEV auraient été stoppées in vivo par la barrière hémato-encéphalique, la barrière placentaire ou encore détruites par le système immunitaire. Les mises au point de cette expérimentation sont en cours, en suivant un protocole d'injection périphérique dans la veine temporale des nouveau-nés décrit par Gombash et al. (Gombash Lampe et al., 2014). L'objectif principal est de déterminer s'il existe un passage des sEV ou de certains de leur composant au niveau cérébral (mesure de la fluorescence du PKH67 en FACS après lysat du cerveau), et l'objectif secondaire est de définir des conditions de temps et dose optimales afin de potentiellement mettre en place des études *in vivo* par la suite.

2. Impact de l'infection par le Cytomégalovirus sur les petites vésicules extracellulaires issues d'explants placentaires *ex vivo*

2.1. Article : « Le hCMV modifie l'expression de marqueurs de surface des petites vésicules extracellulaires isolées d'histocultures placentaires de premier trimestre »

L'utilisation de modèles cellulaires, bien que réductionniste, permet de gagner en reproductibilité et de disséquer en détail les mécanismes biologiques impliqués en conditions physiologiques ou pathologiques. Après avoir caractérisé en détail la composition des sEV au cours d'une infection par le hCMV dans le modèle trophoblastique de cellules HIPEC, nous avons complété notre recherche avec un autre modèle plus proche de la physiologie. Notre équipe a mis au point il y a quelques années un modèle d'étude d'explants placentaires de premier trimestre issus d'IVG. Ces explants placentaires sont conservés en culture à l'interface air-liquide sur une longue période de quinze jours. Ce modèle d'histocultures placentaires ex vivo est permissif à l'infection par le hCMV (Benard et al., 2014; Lopez et al., 2011). Nous avons adapté ce modèle de placenta infecté par hCMV afin de récolter les sEV produites par le tissu placentaire au cours des quinze jours de culture et les résultats obtenus sont présentés dans l'article joint intitulé «Human Cytomegalovirus infection changes the pattern of surface markers of small extracellular vesicles isolated form first trimester placental histocultures », publié le 10 septembre 2021 dans Frontiers in Cell and Developmental Biology (doi : 10.3389/fcell.2021.689122). Nous avons pour ce travail obtenu l'accord des CPP grâce au centre de ressources biologiques Germethèque (numéro d'autorisation CPP.2.15.27).

Dans le travail présenté dans l'article joint, nous avons montré que bien que la sécrétion des sEV soit conservée, la composition des sEV produites par le tissu placentaire infecté *in vitro* par le hCMV était modifiée par rapport à la condition contrôle non infectée (issue du même placenta). Nous avons notamment remarqué une surexpression des marqueurs protéiques CD81 et EpCAM (= CD326) à la surface des sEV issues de placenta infectés par le hCMV, par comparaison au placenta non-infecté. Ces deux protéines présentent un intérêt particulier dans

le cadre de l'infection placentaire par le hCMV. La tétraspanine CD81 est en effet connue pour participer à l'entrée virale du hCMV, notamment *via* ses interactions avec CD9 et CD44 qui forment des plateformes d'entrée cellulaire pour le virus (Fast et al., 2018; Viswanathan et al., 2017). Concernant l'expression de CD326/EpCAM, CD326 est exprimée à la surface de certaines sous populations trophoblastiques. Nagao *et al.* ont montré que le KO d'EpCAM chez des souris induit des défauts massifs de placentation et n'est pas viable pour les fœtus (Nagao et al., 2009). Comme décrit dans l'introduction, la placentation optimale nécessite en effet un équilibre fin entre invasion trophoblastique et respect des structures maternelles.

En plus de la mise au point d'un modèle de choix pour étudier l'impact de stress infectieux sur les sEV placentaires, ce travail a donc confirmé l'hypothèse selon laquelle les sEV de placentas infectés par le hCMV pourraient jouer un rôle fonctionnel au cours de l'infection virale. La surexpression de CD326 et CD81 pourrait en effet jouer un rôle respectivement sur le bon développement placentaire et sur la dissémination virale. Cette dernière hypothèse a été examinée dans l'article précédemment présenté en partie /résultats 1.1./ Les sEV issues d'histocultures placentaires exercent un rôle pro-viral sur des cellules souches neurales naïves de toute infection par le hCMV, la sécrétion des sEV placentaires ne subit pas de modification significative, mais que leur composition en marqueurs de surface protéiques est modifiée, et pourrait potentiellement moduler certains mécanismes physiopathologiques au cours de l'infection par le hCMV (invasion trophoblastique et entrée virale).

Article « « Le hCMV modifie l'expression de marqueurs de surface des petites vésicules extracellulaires isolées d'histocultures placentaires de premier trimestre » publié dans Frontiers in Cell and Developmental Biology le 10 septembre 2021 / doi : 10.3389/fcell.2021.689122 :



OPEN ACCESS

Yale University, United States

cecile.malnou@univ-tlse3.fr

[†]These authors have contributed

equally to this work and share first

Sidra Medicine, Well-Cornell College,

Weizmann Institute of Science, Israel

Edited by:

Anna Onnis, University of Siena, Italy **Reviewed by:**

Mancy Tong,

Eval Scheiter,

authorship

Doha, Qatar

Biology

Citation:

*Correspondence: Cécile E. Malnou

[‡]Present address:

Specialty section:

a section of the journal

Received: 31 March 2021

Published: 10 September 2021

Accepted: 28 July 2021

Bergamelli M, Martin H, Bénard M, Ausseil J, Mansuy J-M,

Hurbain I, Mouysset M,

Groussolles M, Cartron G, Tanguy le Gac Y, Moinard N,

Raposo G, Gonzalez-Dunia D, D'Angelo G and Malnou CE (2021)

Human Cytomegalovirus Infection

Changes the Pattern of Surface

doi: 10.3389/fcell.2021.689122

Long-Term Histocultures. Front. Cell Dev. Biol. 9:689122.

Suberbielle E, Izopet J, Tscherning C,

Markers of Small Extracellular Vesicles Isolated From First Trimester Placental

This article was submitted to Membrane Traffic.

Frontiers in Cell and Developmental

Charlotte Tscherning.

Division of Neonatology

ORIGINAL RESEARCH published: 10 September 2021 doi: 10.3389/fcell.2021.689122



Human Cytomegalovirus Infection Changes the Pattern of Surface Markers of Small Extracellular Vesicles Isolated From First Trimester Placental Long-Term Histocultures

Mathilde Bergamelli¹¹, Hélène Martin¹¹, Mélinda Bénard^{1,2}, Jérôme Ausseil^{1,3}, Jean-Michel Mansuy⁴, Ilse Hurbain^{5,6}, Mailys Mouysset¹, Marion Groussolles^{1,7,8}, Géraldine Cartron⁹, Yann Tanguy le Gac⁹, Nathalie Moinard^{10,11}, Elsa Suberbielle¹, Jacques Izopet^{1,4}, Charlotte Tscherning^{1‡}, Graça Raposo^{5,6}, Daniel Gonzalez-Dunia¹, Gisela D'Angelo⁵ and Cécile E. Malnou^{1*}

¹ Institut Toulousain des Maladies Infectieuses et Inflammatoires (Infinity), INSERM, CNRS, UPS, Université de Toulouse, Toulouse, France, ² Service de Néonatalogie, CHU Toulouse, Hôpital des Enfants, Toulouse, France, ³ Laboratoire de Biochimie, CHU Toulouse, Hôpital Rangueil, Toulouse, France, ⁴ Laboratoire de Virologie, CHU Toulouse, Hôpital Purpan, Toulouse, France, ⁶ CNRS UMR 144, Structure et Compartiments Membranaires, Institut Curie, Université Paris Sciences et Lettres, Paris, France, ⁶ CNRS UMR 144, Plateforme d'Imagerie Cellulaire et Tissulaire (PICT-IBiSA), Institut Curie, Université Paris Sciences et Lettres, Paris, France, ⁷ Service de Diagnostic Prénatal, CHU Toulouse, Hôpital Paule de Viguier, Toulouse, France, ⁸ INSERM UMR 1027, UPS, Equipe SPHERE Epidémiologie et Analyses en Santé Publique: Risques, Maladies Chroniques et Handicaps, Université de Toulouse, France, ⁹ Service de Gynécologie Obstétrique, CHU Toulouse, Hôpital Paule de Viguier, Toulouse, France, ¹⁰ Développement Embryonnaire, Fertilité, Environnement (DEFE), INSERM UMR 1203, Université de Toulouse et Université de Montpellier, Montpellier, France, ¹¹ CECCS, Groupe d'Activité de Médecine de la Reproduction, CHU Toulouse, Hôpital Paule de Viguier, Toulouse, France

Extracellular vesicles (EVs) have increasingly been recognized as key players in a wide variety of physiological and pathological contexts, including during pregnancy. Notably, EVs appear both as possible biomarkers and as mediators involved in the communication of the placenta with the maternal and fetal sides. A better understanding of the physiological and pathological roles of EVs strongly depends on the development of adequate and reliable study models, specifically at the beginning of pregnancy where many adverse pregnancy outcomes have their origin. In this study, we describe the isolation of small EVs from a histoculture model of first trimester placental explants in normal conditions as well as upon infection by human cytomegalovirus. Using bead-based multiplex cytometry and electron microscopy combined with biochemical approaches, we characterized these small EVs and defined their associated markers and ultrastructure. We observed that infection led to changes in the expression level of several surface markers, without affecting the secretion and integrity of small EVs. Our findings lay the foundation for studying the functional role of EVs during early pregnancy, along with the identification of new predictive biomarkers for the severity and outcome of this congenital infection, which are still sorely lacking.

Keywords: early placenta, extracellular vesicles, congenital infection, human cytomegalovirus, placental histoculture

1

September 2021 | Volume 9 | Article 689122

INTRODUCTION

Long considered as a passive barrier, the placenta is now recognized as a main actor in orchestrating the numerous exchanges between the mother and the fetus, in protecting the fetus against infections and allowing adaptation of the maternal metabolism to pregnancy (McNanley and Woods, 2008; Burton and Fowden, 2015). In the past decade, a new mode of communication of the placenta with both maternal and fetal sides has been described and extensively studied, consisting of the secretion of placental extracellular vesicles (EVs), which increases along the pregnancy and stops after delivery (Luo et al., 2009; Sarker et al., 2014). EVs are membranous nanovesicles released by cells into the extracellular space and body fluids, under physiological and pathophysiological conditions (van Niel et al., 2018; Kalluri and LeBleu, 2020). In a simplistic way, we can distinguish large microvesicles (up to 1 µm), derived from an outward budding of the plasma membrane; and exosomes (ranging from 30 to 200 nm in diameter) generated by inward budding of the membrane of late endosomes, leading to a multivesicular body that will fuse with the plasma membrane and release its content into the extracellular space. Discrimination between the different types of EVs based on their biogenesis pathway and/or physical characteristics is still the subject of many studies and their classification is continuously evolving (Colombo et al., 2014; Kowal et al., 2016; van Niel et al., 2018; Kalluri and LeBleu, 2020). Hence, as it is often difficult to clearly prove the exact nature of exosomes compared to other vesicle subtypes, the term exosome has sometimes been used improperly in the literature, which must be interpreted with caution. Indeed, the literature devoted to placental EVs can sometimes lead to confusion as to the nature of the EVs examined. Some studies have rigorously examined the different categories of EVs, and have underlined the importance of small EVs (sEVs, i.e., exosomes) in several pathologies of pregnancy (Adam et al., 2017; Salomon and Rice, 2017; Sadovsky et al., 2020), even if large EVs (also called microvesicles) also play an undeniable role during pregnancy. Notably, an antiviral role has been specifically attributed to sEVs derived from isolated cytotrophoblasts of term placenta (Delorme-Axford et al., 2013; Ouyang et al., 2016). We have, therefore, chosen to focus on sEVs and to use this terminology, in accordance with the ISEV guidelines (Thery et al., 2018).

Interestingly, placental sEVs are detected in the maternal serum during pregnancy and their composition is altered upon placental pathologies such as diabetes mellitus, intrauterine growth restriction or preeclampsia (Salomon et al., 2016; Cuffe et al., 2017; Chiarello et al., 2018; Miranda et al., 2018; Herrera-Van Oostdam et al., 2019; Kandzija et al., 2019; Malnou et al., 2019). Thus, sEVs may represent valuable non-invasive biomarkers reflecting the status of the placenta and of the pregnancy (Mitchell et al., 2015; Jin and Menon, 2018). Moreover, as sEVs can be internalized by recipient cells and exert biological function, any alteration of their cargo may modify their normal activity (Kalluri and LeBleu, 2020; Sadovsky et al., 2020). In this context, it is important to develop relevant models which allow preparation of placental sEVs in a robust and reproducible manner, in order to guarantee their use for downstream analysis. In this regard, early placentas appear to be wellsuited experimental models, since many pregnancy pathologies and developmental defects are the result of placental insults occurring during the first trimester of pregnancy (Montiel et al., 2013; O'Tierney-Ginn and Lash, 2014; Silasi et al., 2015). In this context, the use of tissue explants is particularly relevant since they preserve the tissue cyto-architecture. This allows deciphering the complex mechanisms of (patho)physiological processes, and enables the study of sEV secretion over several days, which is not feasible with most other currently available models (Grivel and Margolis, 2009; Fitzgerald et al., 2018).

Among many environmental agents, viral congenital infections are a major cause of impaired placental and fetal development. Infection by human cytomegalovirus (hCMV) concerns 1% of live births in developed countries and is responsible for various placental and fetal damage, especially at the level of the fetal central nervous system, leading to diverse brain disorders (Kenneson and Cannon, 2007; Cannon et al., 2010; Lanzieri et al., 2015). Currently, non-invasive diagnostic tools to assess fetal hCMV infection are lacking and very few, easily implementable methods to predict fetal impairment exist, especially concerning neurosensorial damage (Benoist et al., 2008; Guerra et al., 2008; Leruez-Ville and Ville, 2017). Thus, the identification of non-invasive diagnosis and prognosis biomarkers within sEVs would be a great step forward in assessing placental and fetal damage and would provide a valuable decision support tool. Finally, to date, the functional role of sEVs in the context of placental infection by hCMV and their contribution to placental dysfunction are not known.

In this work, we have optimized a histoculture model of first trimester placental explants, previously developed in our team (Lopez et al., 2011; Benard et al., 2014), to isolate sEVs with a purity compatible with analyses of their composition and features. This model, permissive to hCMV infection (Lopez et al., 2011; Benard et al., 2014), enabled the purification of sEVs devoid of contaminant viral particles. We showed that the secretion and integrity of sEVs was preserved upon hCMV infection, with significant modifications in the expression levels of sEV surface proteins. Thus, this model opens up promising prospects for modeling chronic stresses at the start of pregnancy, including viral infections, to identify biomarkers necessary to detect very early placental and fetal damage and to study the physiological relevance of sEVs for placental development and function.

MATERIALS AND METHODS

Human Ethic Approval

The biological resource center Germethèque at the Toulouse site (BB-0033-00081) obtained the consent form from each patient for the use of samples included in this study (CPP.2.15.27) in order to carry out the research program. The steering committee gave its approval for the realization of this study on Feb 5th, 2019. The hosting request made to Germethèque bears the number 20190201 and its contract is referenced under the number 19 155C. The biological resource center has a

September 2021 | Volume 9 | Article 689122

declaration DC-2014-2202 and an authorization AC-2015-2350. In accordance with privacy policies concerning voluntary pregnancy termination, the only collected associated clinical data was the term at which the pregnancy was terminated (in weeks) and the age of the women at the time of pregnancy termination.

hCMV Viral Strain, Viral Stock Production and Titration

The viral strain of hCMV used in this study is the endotheliotropic VHL/E strain (a kind gift from C. Sinzger, University of Ulm, Germany) (Stegmann et al., 2019). Viral stocks were made by amplification of the virus on MRC5 cells and concentration by ultracentrifugation, as described previously (Rolland et al., 2016). Virus titration was determined by indirect immunofluorescence assays against the Immediate Early (IE) antigen of hCMV upon infection of MCR5 by serial dilutions of the viral stock (Rolland et al., 2016). Additionally, virus titration was also performed by qPCR as described on viral stocks and placental histoculture supernatants (Mengelle et al., 2016).

Placental Histoculture and Infection

Placental histocultures were adapted from the model we previously described and validated (Figure 1A) (Rauwel et al., 2010; Lopez et al., 2011; Benard et al., 2014). First trimester placentas [21 placentas; mean = 11.72 ± 0.39 (SEM) weeks of amenorrhea, i.e., 9.72 ± 0.39 weeks of pregnancy; age of the women: mean = 30.71 ± 2.35 (SEM) year-old] were collected following elective abortion by surgical aspiration at Paule de Viguier Maternity Hospital (Toulouse, France) by the medical team, and immediately subjected to dissection. Isolation of trophoblastic villi was performed from total placental tissue by manual dissection in Phosphate Buffer Saline (PBS), with particular care to exclude decidua, membranes and umbilical cord. Tissues were repeatedly washed in PBS to eliminate red blood cells. Each placenta was dissected in small pieces (2-3 mm³) and kept overnight in "Exofree" medium (see "Isolation of sEVs" section) in a 5% CO2 incubator at 37°C, to eliminate the remaining red blood cells. To infect placental explants by hCMV upon dissection, an overnight incubation was performed with 500 µl of hCMV pure viral stock (corresponding to around 10⁸ focus forming units, ffu) mixed with 500 µl of Exofree medium. The day after (day 0), explants were washed six times in PBS and installed, nine by nine, on re-hydrated gelatin sponges (Gelfoam, Pfizer) in each well of a 6-well plate containing 3 ml of Exofree medium (Figure 1A). A minimum of six wells, i.e., 54 explants, were used per placenta for each experimental condition (i.e., non-infected or infected). Conditioned medium was collected and completely replaced with fresh Exofree medium every 3 to 4 days for the duration of the culture.

To maximize the recovery of sEVs and obtain a rate production compatible with further analyses, conditioned media obtained were pooled until EV purification, for each experimental condition for one given placenta. At two time points during culture, 300 μ l of culture supernatants were used to measure β -Human Chorionic Gonadotropin (β -HCG) levels. Free β -HCG was measured on a COBAS system (Roche Diagnostics, Switzerland), modular analytics E170, cobas e601 according to manufacturer protocol (Application Code Number 033) and according to a published method (Sturgeon and McAllister, 1998). In addition to β -HCG dosage, release of virus by infected explants, indicating active viral replication, was assessed by hCMV qPCR titration on supernatant, as described above (Mengelle et al., 2016).

At the end-point of the histoculture, total collected medium was used to perform sEV isolation. Placental explants were weighed in order to normalize, calculate sEV yield and define an appropriate resuspension volume upon sEV preparation. Three explants were used for immuno-histochemistry and the others were frozen at -80° C for further analyses.

Immuno-Histochemistry

Placental explants were fixed in formalin during 24 h at room temperature and embedded in paraffin. Tissue sections (5 µm) were de-waxed using xylene and alcohol and epitope retrieval was carried out using citrate buffer (pH 6) at 95°C during 20 min. Sections were re-hydrated using TBS 0.01% Tween 20 for 5 min and blocked with 2.5% horse serum for 20 min. Immunostainings were performed with the following antibodies: rabbit anti-Cytokeratin-7 (Genetex; 2 µg/mL), mouse anti-Vimentin (Santa-Cruz; 2 µg/mL) and mouse anti-placental alkaline phosphatase (Biolegend; 1 µg/mL). Immunostaining for hCMV was performed as previously described (Benard et al., 2014), using a mouse monoclonal antibody directed against the hCMV IE antigen (clone CH160, Abcam). Secondary antibody-coupled to biotin was then used prior to Vectastain RTU elite ABC Reagent (Vector laboratories) and staining by diaminobenzidine (DAB). Sections were finally counterstained with hematoxylin. Image acquisition was performed on a Leica DM4000B microscope or on a Panoramic 250 scanner (3DHISTECH).

TUNEL Assay

TUNEL assay was done using Click-iT Plus TUNEL Assay for *In Situ* Apoptosis Detection kit (Life Technologies), following manufacturer instructions. Briefly, paraffin-embedded tissue sections were de-waxed using xylene and alcohol and fixed in 4% PFA during 15 min at 37°C. After two washes in PBS, permeabilization was realized with proteinase K during 30 min at 37°C, followed by two other washes and a re-fixation step with 4% PFA during 5 min at 37°C. TUNEL assay was then carried out on tissue sections by following manufacturer protocol, by pretreating one sample by DNAse I during 30 min at 37°C as a positive control. Image acquisition was performed on a Zeiss Axiovert 200 microscope.

Isolation of sEVs

To purify sEVs from placental histocultures, culture media was depleted beforehand from EVs (Thery et al., 2018). To this aim, Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM with Glutamax, Gibco) supplemented with 20% Fetal Bovine Serum (FBS, Sigma-Aldrich) was ultracentrifuged at 100,000 g for 16 h at 4°C (rotor SW32Ti, with maximal acceleration and brake) and filtered at 0.22 μ m. "Exofree" medium was then obtained by a 1:1 dilution

Bergamelli et al.





with DMEM to reach 10% FBS and addition of antibiotics at the following concentrations: 100 U/ml penicillin – 100 μ g/ml streptomycin (Gibco), 2,5 μ g/ml amphotericin B (Gibco) and 100 μ g/ml normocin (Invivogen).

All steps were then performed at 4°C and PBS solution was filtered on a 0.22 μ m filter. Procedures were adapted from Thery et al. (2006), Ouyang et al. (2016), Zicari et al. (2018) according to ISEV guidelines (Thery et al., 2018) and are presented in **Figure 2A**. From collected histoculture media, several differential centrifugation steps were carried out: a first preclearing centrifugation for 30 min at 1,200 g to eliminate dead cells and large debris, a second ultracentrifugation for 30 min at 12,000 g (rotor SW32Ti, with maximal acceleration and brake) to eliminate large EVs (principally microvesicles), and a last ultracentrifugation of the remaining supernatant for 1 h at 100,000 g (Rotor SW32Ti, with maximal acceleration and brake) allowed to pellet sEVs. The pellet was then resuspended either in 100 μ I PBS or in diluent C (Sigma) in order to stain the vesicles by the lipophilic dye PKH67 (Sigma) according to the manufacturer's instructions (5 min incubation; 1:1,000 dilution). sEVs were then resuspended in a solution of 40% iodixanol in sucrose and the last purification step was carried


out by ultracentrifugation on a discontinuous iodixanol/sucrose gradient (10 to 40% iodixanol) with deposition of the sEVs on the bottom of the tube, during 18 h at 100,000 g (rotor SW41Ti, acceleration 5, no brake). The fractions 2 + 3 of the six fractions harvested were then pooled and washed in 25 ml PBS. After a last ultracentrifugation for 1 h at 100,000 g (Rotor SW32Ti, with maximal acceleration and brake), the sEV pellet was resuspended in PBS, in a volume proportional to the weight of tissue (1 µl PBS per 1 mg tissue) and stored at -80° C. We submitted all relevant data of our experiments to the EV-TRACK knowledgebase (EV-TRACK ID: EV200049) and obtained an EV-METRIC score of 100% (Consortium et al., 2017).

sEV Flow Cytometry

A Macsquant VYB Flow Cytometer (Myltenyi Biotec) was calibrated using Megamix-plus SSC FITC (Biocytex Stago) beads to standardize sEV measurements. Megamix-plus SSC beads of variable diameters (160 nm, 200 nm, 240 nm, and 500 nm) were separated depending on size using SSC side scatter. A gating strategy was defined on 160 nm and 200 nm beads populations to analyze events of size below 200 nm (**Figure 2B**).

sEV preparations, previously stained with PKH67 as described above, were diluted 1:200 in filtered PBS and analyzed with the same parameters as those used for calibration beads. Gating on events of size below 200 nm allowed count of sEVs and calculation of their concentration for each preparation (**Figure 2C**). Each sample was analyzed twice. Data were then analyzed with FlowJo software (BD).

Nanoparticle Tracking Analysis

sEV preparations were diluted 1:100 in filtered PBS ($0.2 \,\mu$ m) and tracked using a NanoSight LM10 (Malvern Panalytical) equipped with a 405 nm laser. Videos were recorded three times during 60 s for each sample at constant temperature (22° C) and analyzed with NTA Software 2.0 (Malvern instruments Ltd). Data were analyzed with Excel and GraphPad Prism (v8) softwares.

Transmission Electron Microscopy and Immunolabeling Electron Microscopy

Procedures were performed essentially as described (Raposo et al., 1996; Hurbain et al., 2017).

For transmission electron microscopy (TEM), sEV preparations were loaded on copper formvar/carbon coated grids (Ted Pella). Fixation was performed with 2% paraformaldehyde in 0.1 M phosphate buffer (pH 7.4), followed by a second fixation with PBS 1% glutaraldehyde in PBS. Samples were stained with 4% uranyl acetate in methylcellulose.

For immunolabeling electron microscopy (IEM), sEV preparations were loaded on grids and fixed with 2% paraformaldehyde in 0.1 M phosphate buffer (pH 7.4). Immunodetection was performed with a mouse anti-human CD63 primary antibody (Abcam ab23792). Secondary incubation was next performed with a rabbit anti mouse Fc fragment (Dako Agilent Z0412). Grids were incubated with Protein A-Gold 10 nm (Cell Microscopy Center, Department of Cell Biology, Utrecht University). A second fixation step with 1% glutaraldehyde in

PBS was performed. Grids were stained with uranyl acetate in methylcellulose.

All samples were examined with a Tecnai Spirit electron microscope (FEI, Eindhoven, The Netherlands), and digital acquisitions were made with a numeric 4k CCD camera (Quemesa, Olympus, Münster, Germany). Images were analyzed with iTEM software (EMSIS) and statistical studies were done with Prism-GraphPad Prism software (v8).

Multiplex Bead-Based Flow Cytometry Assay

sEV preparations were subjected to bead-based multiplex EV analysis by flow cytometry using the MACSPlex Exosome Kit, human (Miltenyi Biotec), according to the manufacturer's instructions (Koliha et al., 2016).

Briefly, sEV preparations were incubated overnight with 39 different bead populations, each coupled to a different capture antibody. The different bead populations are distinguishable by flow cytometry by a specific PE and FITC labeling. sEVs bound to the beads were then detected with a cocktail composed by anti-CD63, anti-CD9, and anti-CD81 antibodies coupled to APC. Beads coupled to isotype control antibodies were used to assess potential non-specific binding of sEVs. Background was also defined by performing the analysis without any sEVs.

Flow cytometry analysis was performed with a MACSQuant Analyzer 10 flow cytometer (Miltenyi Biotec). The tool MACSQuantify was used to analyze flow cytometry data (v2.11.1746.19438). The background signals were subtracted from the signals obtained for beads incubated with sEVs. GraphPad Prism (v8) software was used to perform statistical analysis of the data.

Western Blot

sEV samples were lysed in non-reducing conditions in Laemmli buffer, heated for 5 min at 95°C, and loaded on mini protean TGX precast 4-20% gradient gels (Biorad) in Tris-glycine buffer for electrophoresis at 110 V for 2 h. Proteins were electrotransferred onto nitrocellulose membranes using the trans-blot turbo transfer system (Biorad) and membranes were blocked with Odyssey blocking buffer (Li-Cor Biosciences) for 1 h. Membranes were then incubated with primary antibodies: mouse anti-CD81 (200 ng/ml, Santa-Cruz), mouse anti-CD63 (500 ng/ml, BD Pharmingen) or mouse anti-CD9 (100 ng/ml, Millipore) overnight at 4°C in Odyssey blocking buffer, followed by incubation with the secondary antibody IRDye 700 goat antimouse IgG (Li-Cor Biosciences), for 1 h at room temperature. Membranes were washed three times in TBS 0.1% Tween 20 during 10 min after each incubation step and visualized using the Odyssey Infrared Imaging System (LI-COR Biosciences).

RESULTS

To isolate sEVs and standardize their production from placental tissue, we optimized a placental histoculture protocol previously developed and characterized by our team (Lopez et al., 2011; Benard et al., 2014). First trimester placenta explants were

Frontiers in Cell and Developmental Biology | www.frontiersin.org

cultured and sampled at different time points (Figure 1A). At the end of the culture, tissue sections showed nearly no apoptotic cells as assessed by TUNEL assay (Figure 1B). The secretion of high levels of β -HCG confirmed the viability and secretory capacity of placental explants (Polliotti et al., 1995) (Figure 1C). In agreement with our previous studies (Lopez et al., 2011), β-HCG levels gradually decreased, but remained sustained throughout the experiment. Assessment of tissue architecture and integrity was also performed at the end of the culture; tissue sections were examined for the expression of Cytokeratin-7 (CK-7; trophoblast marker), placental alkaline phosphatase (PLAP; syncitiotrophoblast marker) and Vimentin (mesenchymal cell marker). We observed a typical double layer of trophoblastic cells, consisting of an outer syncitiotrophoblastic layer and an inner cytotrophoblastic layer, surrounding the villous stroma (Figure 1D). These results indicate that the trophoblastic villi architecture is well preserved during the culture, consistent with our previous works (Lopez et al., 2011; Benard et al., 2014).

We next designed a protocol to maximize the recovery of sEVs and allow their detailed characterization (Figure 2A). After the gradient ultracentrifugation step, the majority of sEVs was found in fractions 2 and 3, corresponding to a density of 1.086 and 1.116, respectively, consistent with the density

expected for sEVs (Kowal et al., 2016; Ouyang et al., 2016). The last sEV pellet was dissolved into a final volume of PBS proportional to tissue weight, to normalize and compare sEV yields between experiments. Except when preparations were used for multiplex bead-based flow cytometry assays, sEVs were stained with the fluorescent lipophilic dye PKH67 before gradient ultracentrifugation, to allow their counting by flow cytometry (**Figure 2A**). The flow cytometer was calibrated with FITC-fluorescent beads of different sizes to define gating parameters before analysis of sEV preparations (**Figure 2B**). Only vesicles smaller than 200 nm of diameter were counted; the majority of the analyzed events displayed an approximate size smaller than 160 nm (**Figure 2C**). The average yield obtained was of 29,459 \pm 5,370 sEV per mg of tissue (mean \pm SEM).

To further describe the population of purified sEVs, we performed nanoparticle tracking analyses (NTA). Concentrations of sEVs determined for four independent preparations laid in the same range as the ones determined by flow cytometry and the comparison of the results obtained by the two methods showed no significant difference (p = 0.3415 by paired-t test; **Supplementary Table 1**). The mode sizes for the four sEV preparations determined by NTA ranged between 125.7 and 170.7 nm, with a mean of 145.8 \pm 9.3 nm (**Figures 3A,B**). Next,



Frontiers in Cell and Developmental Biology | www.frontiersin.org

we performed an exhaustive morphological characterization of placental sEVs by TEM (**Figures 3C,D**). The preparations were highly enriched in vesicles with the typical membranous appearance of sEVs (**Figure 3C** and **Supplementary Figure 1**). The average relative size of sEV was determined using isolated sEVs from two independent preparations. By focusing only on selected sEVs according to their structures, we measured an average diameter of 97 and 91 nm for both preparations. More precisely, by observing sEV size distribution, the majority of sEV diameters was around 80 nm (**Figure 3D**).

Next, a multiplex bead-based flow cytometry assay was carried out to establish a map of sEV surface markers (**Figure 4A**). An assay enabling the simultaneous detection of up to 37 different EV surface markers in a semi-quantitative way was used (Koliha et al., 2016; Wiklander et al., 2018). We observed a



highly positive signal for the canonical tetraspanin CD63, known to be enriched in endosome-derived exosomes, that was also detected by western blot in sEV preparations (Figure 4B). As observed in Figure 4C (and in Supplementary Figure 2), the majority of sEVs were strongly positive for CD63 as evaluated by IEM. A manual counting of CD63-positive sEVs among total sEVs indicated that 60.32 and 61.83% sEVs expressed CD63 for two independent preparations. Finally, two other canonical sEV surface proteins, CD9 and CD81, were expressed in the sEV preparations (Figure 4A). Altogether, these data indicate that isolated sEVs show the typical features of canonical exosomes, regarding ultrastructure, size and the presence of typical exosome markers.

The bead-based flow cytometry assay also revealed that several proteins expressed by trophoblastic cells were present at the surface of sEV, including CD24 (previously described on trophoblastic EVs) (Sammar et al., 2017), CD49e (also known as integrin α 5) (Lee et al., 2016), CD105 (Gregory et al., 2014), CD146 (also named MCAM) (Higuchi et al., 2003) or CD236 (also known as EpCAM) (Wong et al., 2019). Conversely, expression of non-trophoblastic markers, including CD4, CD8, CD31, CD45 or HLA-ABC (Blaschitz et al., 2001; Lee et al., 2016) was not detected on sEVs preparations. Of note, reported markers of placental mesenchymal stem cells were also found at the surface of isolated sEV like CD29 (also known as integrin β 1), CD44 and SSEA-4 (Salomon et al., 2013; Lv et al., 2014), indicating that these cells may also contribute to sEV secretion in the histocultures.

Next, the impact of hCMV infection on the secretion and characteristics of placental sEVs was examined. Placental explants were infected by the VHL/E clinical strain overnight, extensively washed and maintained in culture during two weeks to favor virus dissemination (Lopez et al., 2011). To monitor virus release into the culture medium, we sampled one aliquot of histoculture supernatant (corresponding to virus released between days 7 and 11), which was analyzed by qPCR. Placental explants displayed active viral release, with hCMV titers in the supernatant comprised between 1.05 \times 10^4 and 1.53 \times 10^7 copies/ml, the median being around 3.04×10^5 copies/ml (Figure 5A). Importantly, these titers were due to virus release and did not correspond to remaining inoculum, since no viral genome could be detected by control qPCR experiments using UVirradiated virus (data not shown). Moreover, analysis of the tissue sections by immunohistochemistry at the end of the culture confirmed the presence of the IE viral antigen (Figure 5B). Some cells showed intense staining, demonstrating that the virus disseminated well into the tissue after two weeks. Viral infection did not modify the weight of tissue upon culture compared to non-infected conditions (Figure 5C), neither did the levels of secreted β -HCG which remained similar between noninfected and infected placentas for both measures (Figure 5D). Finally, the tissue architecture remained well preserved, as attested by immunohistochemistry performed against CK-7, PLAP, and Vimentin (Figure 5E), thereby ensuring that the sEV preparations were not isolated from dying tissues.

Finally, the characteristics of the sEVs secreted by noninfected or infected placental histocultures were compared. The protocol for sEV preparation, which combines differential ultracentrifugation and gradient ultracentrifugation steps, guaranteed that viral particles did not contaminate sEV preparations, consistent with previous findings (Zicari et al., 2018; Turner et al., 2020). Indeed, hCMV particles are bigger and denser than sEVs and are not co-purified with sEVs upon density gradient ultracentrifugation (Zicari et al., 2018; Turner et al., 2020). The absence of infectious viral particles in sEV fractions was actually confirmed by applying sEVs purified from infected placental explants to MCR5 cells and performing an anti-IE immunofluorescence assay. As expected, no IE expression was detected (**Supplementary Figure 3**). Moreover, no viral particle was detected by TEM in sEV preparations in all the wide field pictures examined (exemplified in **Supplementary Figure 4**).

When comparing yields of purified sEVs in non-infected *versus* infected histocultures, no significant differences were observed (Figure 6A), indicating that hCMV infection did not affect the global production of sEV by placental tissue. By TEM, sEVs secreted from infected explants displayed the same morphology (Figure 6C and Supplementary Figure 4) and relative size distribution than sEVs isolated from non-infected histocultures (Figure 6D), with no significant difference in their mean size (Figure 6E). sEVs from hCMV-infected explants also expressed CD63, detected both by western blot (Figure 6B) and by IEM (Figures 6F,G and Supplementary Figure 5), being expressed on nearly 60% of the vesicles (Figure 6H).

Finally, the surface expression levels of several proteins expressed by sEVs were examined by multiplex bead-based flow cytometry assay in both conditions (Figure 6I). To perform this assay, quantification of the sEVs by PKH67-based flow cytometry could not be realized, since it would interfere with the assay. Instead, sEV quantity was normalized between noninfected and infected conditions based on the weight of the explants, since hCMV infection did not modify the yield of sEV secretion (Figure 6A). sEVs isolated from hCMV infected explants expressed the same markers than sEVs isolated from non-infected explants, albeit with significant differences for some of them in their expression levels upon infection (Figure 6I). A 2-way ANOVA statistical test confirmed that the infection modified the global pattern of expression of sEV surface proteins (p < 0.0001 for the "Infection" factor, no interaction with "Marker" factor). Most of the surface markers expressed in sEV isolated from infected explants showed an increased expression upon infection. Bonferroni's multiple comparison test indicated that two markers were significantly increased: CD81 (p = 0.0223) and CD326 (EpCAM; p = 0.0029). In conclusion, these findings indicate that hCMV infection of placental explants preserves the secretion of sEVs that conserve the typical characteristics of exosomes with a global modification of the expression levels of some surface proteins.

DISCUSSION

An increasing number of works focus on placental EVs and their role in physiological and pathological pregnancies



Frontiers in Cell and Developmental Biology | www.frontiersin.org



Frontiers in Cell and Developmental Biology | www.frontiersin.org

FIGURE 6 | (Continued)

western blot preserves its rich glycosylated pattern. MW = molecular weight. (C) Placental sEV isolated from non-infected (NI) versus infected (hCMV) placental explants, obtained by TEM. These pictures are representative of two independent experiments. Scale bar = 100 nm. (D) Frequency distribution analysis of placental sEV size, compared between non-infected (NI) versus infected (hCMV) placental explants. Each bar of the histogram represents the mean \pm SEM of the relative frequency per bin (bin width = 20 nm) of two independent experiments. Placental sEV size were measured manually with iTEM measure tool. Total sEV count was 172 and 208 for the NI replicates; 176 and 185 for the hCMV replicates. ns, non-significant (p = 0.8814) by nested t-test. (E) Mean size \pm SEM of placental explants, calculated from the experiments presented in (D). ns, non-significant (p = 0.8871) by nested t-test. (F) Placental explants, placental sEV using antibodies against CD63 (gold bead size = 10 nm), purified from non-infected (NI; F) versus infected (hCMV; G) placental explants (n = 2). Scale bar = 100 nm. (H) Percentage of placental sEV positive for CD63 (at least 1 bead counted per sEV) for two independent experiments. Total sEV count was 189 and 263 for sEV isolated from non-infected placental explants; 143 and 594 for sEV isolated from infected (NCMV) placental explants, based on the multiplex flow cytometry MACSPlex exosome kit assay. Results are represented by a heat-map, calculated from 3 independent experiments for different sEV markers indicated on the left column. Blue intensity is proportional to the level expression calculated in Median Fluorescence Intensity, indicated on the right of the heat-map. *****, p < 0.00021 by 2-way ANOVA for "Infection" factor. Bonferrori *post hoc* comparison test indicated significant increase for CD81 (*, p = 0.0023) and CD326 (**, p = 0.0029) for hCMV compared to non-infected (NI) conditions.

(Salomon et al., 2016; Cuffe et al., 2017; Chiarello et al., 2018; Miranda et al., 2018; Herrera-Van Oostdam et al., 2019; Kandzija et al., 2019; Malnou et al., 2019). For these studies, many different models have been used as a source of EVs, both in vivo, ex vivo or in vitro. In vivo study of placental EVs isolated from blood is hard to interpret because they come from multiple tissues. The use of placental primary cells or cell lines in vitro is very informative, but may lack important aspects of (patho)physiology occurring in a complex tissue architecture, especially during viral infection. An interesting alternative is to use ex vivo models to isolate EVs. For term placenta, some studies use dual lobe perfusion performed during 3h to collect EVs (Dragovic et al., 2015; Kandzija et al., 2019), but this system cannot be applied for first trimester placenta and in the context of viral infections that take time to establish in the tissues. Explant culture models, enabling the maintenance of the tissue in culture for several days, have widely been used for different tissues (Grivel and Margolis, 2009), including placenta (Faye et al., 2005; Hamilton et al., 2012; Fitzgerald et al., 2018). Here, we adapted a previously established model of first trimester placental explants, which can be maintained in culture at the air/liquid interface for at least two weeks and is permissive for hCMV replication (Lopez et al., 2011; Benard et al., 2014). Indeed, we could confirm that the integrity of our placental explants was well preserved, consistent with our previous results (Lopez et al., 2011; Benard et al., 2014), with an expected pattern of β -HCG secretion over time (Polliotti et al., 1995) and without overt apoptosis. Moreover, immunohistochemical analyses further established that the complex cytoarchitecture of the trophoblastic villi was also well preserved at the end of the culture, even upon hCMV infection.

From these placental explants, we developed robust and reproducible conditions for the recovery and isolation of sEVs [EV-METRIC score of 100% (Consortium et al., 2017)], in strict accordance with MISEV guidelines (Thery et al., 2018). We unambiguously demonstrated that the sEV preparations were pure and devoid of contaminants, as evidenced by the assessment of multiple parameters. Notably, we showed that sEV preparations presented many features of endosomal-derived exosomes, including membranous vesicles as observed by TEM, an average relative diameter around 95 nm and the presence of exosome components including CD63, CD9, and CD81.

Contrasting with studies where sEVs are isolated from a single cell type, our goal here was to examine the global population of sEVs secreted from trophoblastic villi. Even if the cellular origin of the vesicles is varied, we reasoned that it may better reflect those of the placental environment and better suited to assess the overall changes of the vesicles following stress. As the tissue architecture was well preserved, it is likely that the outer layers of cyto- and syncitiotrophoblasts contributed to sEV secretion. Indeed, proteins expressed by trophoblasts were detected on the sEV surface, including CD326, CD24 or CD49e (Lee et al., 2016; Sammar et al., 2017; Wong et al., 2019). We also observed the presence of proteins described for mesenchymal stem cells, like CD29, CD44 and SSEA-4, suggesting that such cells might contribute to sEV secretion (Lv et al., 2014; Salomon et al., 2014). Of note, although sEV have different cellular origins, the pattern of expression of surface markers was very reproducible among sEV preparations.

To assess whether this model was relevant for evaluating the consequences of a chronic environmental stress on placental sEVs, we sought to examine the impact of hCMV infection on sEVs secreted by the placental villi. We reasoned that analysis of sEVs from first trimester placenta may be particularly relevant considering the pathophysiology of hCMV congenital infections. Indeed, hCMV efficiently disseminates from the mother to the fetus via an active replication in the placenta tissue (Pereira et al., 2005, 2017). Consistent with previous works (Amirhessami-Aghili et al., 1987; Lopez et al., 2011; Hamilton et al., 2012; Benard et al., 2014), hCMV disseminated well in the placental explants and was released into the medium. Based on immunohistochemistry data, tissue infection levels were similar to what has been observed on placentas during natural infection (Uenaka et al., 2019). Under our conditions of infection, the placental explants kept the same weight and histological structure, and continued to secrete sEVs at yields comparable to the uninfected explants.

To maximize the recovery of sEVs for a deep characterization and downstream analyses, the histoculture supernatants were pooled along the culture. Although this may either hide fluctuations and/or attenuate transient or late trends induced by infection, we observed significant global changes in the

Frontiers in Cell and Developmental Biology | www.frontiersin.org

signature of sEV surface markers upon infection by multiplex bead-based cytometry assay. A significant surface expression increase was observed notably for two proteins: CD326 and CD81. Of note, CD326 (EpCAM) has been suggested to play a role in placental development (Nagao et al., 2009). This surface protein is expressed during the first trimester of pregnancy by a subpopulation of actively dividing trophoblast progenitor cells (Wong et al., 2019). Interestingly, trophoblast progenitor cells are targeted by hCMV infection with important consequences on their ability to differentiate and allow placental development (Tabata et al., 2015). In addition, CD81 has been recently described to play a role in hCMV entry (Viswanathan et al., 2017; Fast et al., 2018). In particular, the presence of CD81 at the surface of host cells, along with CD9 and CD44 for which we also detect a trend for increased expression, is thought to be used as a platform for hCMV entry into cells (Viswanathan et al., 2017). Hence, it is tempting to speculate that the secretion of sEVs with this specific modified pattern of surface proteins upon hCMV infection may have a functional role, by influencing viral dissemination into the tissue and/or contributing to placental development defects.

Currently, there is a growing interest for the discovery of biomarkers reflecting both placental and fetal state, within the placental sEVs, and to address the question of their biological relevance in pathophysiology (Mitchell et al., 2015; Cuffe et al., 2017; Jin and Menon, 2018; Malnou et al., 2019). However, in most models of placental explants described to date, sEVs are generally prepared within the first 16 to 48 h of culture (Tong et al., 2016; Tong and Chamley, 2018), a duration that does not allow to evaluate the longterm effects of chronic stress on sEVs. Hence, our model of early placental explants that can be cultured over several days appears as a very valuable tool to evaluate the impact of chronic environmental stress, including viral infection but also hypoxia or endocrine disruptors, on the phenotype and functional role of sEVs secreted by the placenta in early pregnancy. Ultimately, it could also open new perspectives in the search for biomarkers.

DATA AVAILABILITY STATEMENT

The raw data supporting the conclusions of this article will be made available by the authors, without undue reservation.

ETHICS STATEMENT

The studies involving human participants were reviewed and approved by CPP.2.15.27. The patients/participants provided their written informed consent to participate in this study.

AUTHOR CONTRIBUTIONS

MBer, HM, and MM designed and performed the experiments and analyzed data. MBén, MG, GC, YT, and CT collected clinical samples and data. J-MM, JI, and JA performed viral titrations and β -HCG measures. NM from Germethèque was in charge of ethical issues and received women authorizations. IH, GD'A, and GR supervised electron microscopy experiments and data analysis. CM, MM, and CT got grants for this study. CM conceived and designed the study, analyzed data, and wrote the manuscript, with the help of MBer, GD'A, DG-D, ES, and CT. All authors provided critical feedback and helped shape the research, analysis, and manuscript.

FUNDING

This project has received financial support from the French Society of Neonatology, the French Biomedicine Agency, the Réseau Mère-Enfant de la Francophonie, and the Groupe d'Etudes en Néonatologie Midi-Pyrénées. Our work was also financially supported by institutional grants from Inserm, CNRS, and Toulouse 3 University. This project is part of the doctorate thesis of MBer, who was funded by the Ministry of Education and Research (MESR). The TEM experiments were performed on PICT-IBiSA, Institut Curie, Paris, member of the France-BioImaging national research infrastructure, and were supported by the French National Research Agency through the "Investments for the Future" program (France-BioImaging, ANR-11-INSB-04), supported by the CelTisPhyBio Labex (N° ANR-11-LB0038) part of the IDEX PSL (N°ANR-10-IDEX-0001-02 PSL).

ACKNOWLEDGMENTS

We thank the medical and paramedical staff of the gynecology unit at Paule de Viguier Hospital, who allowed us to have access to the samples, as well as the patients who agreed to participate in the study. We also warmly thank L. Bujan and M. Aubry, from the Germethèque, for their help and professionalism, and C. Sinzger who kindly provided us with the hCMV strain and gave us precious advice for its production. We greatly thank B. Rauwel, M. Romao, C. Mengelle, MF. Coutens, F. Chauvrier, P. Verdy, N. Kopf, and M. Barbet, as well as the whole ViNeDys team, for their technical assistance and their numerous advice and discussions which allowed the progress of this work. We also thank AL. Iscache, V. Duplan-Eche, and F. L'Faqihi-Olive, from the cytometry facility of the Center for Pathophysiology of Toulouse Purpan, as well as to F. Capilla and A. Alloy, from the histology facility Gentoul Anexplo. We finally thank L. Nieto and E. Haanappel from the Institute of Pharmacology and Structural Biology, who granting us access to the Nanosight device and for their support and advice, and L. Khajavi for proofreading of the manuscript.

SUPPLEMENTARY MATERIAL

The Supplementary Material for this article can be found online at: https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fcell.2021. 689122/full#supplementary-material

REFERENCES

- Adam, S., Elfeky, O., Kinhal, V., Dutta, S., Lai, A., Jayabalan, N., et al. (2017). Review: Fetal-maternal communication via extracellular vesicles - Implications for complications of pregnancies. *Placenta* 54, 83–88. doi: 10.1016/j.placenta. 2016.12.001
- Amirhessami-Aghili, N., Manalo, P., Hall, M. R., Tibbitts, F. D., Ort, C. A., and Afsari, A. (1987). Human cytomegalovirus infection of human placental explants in culture: histologic and immunohistochemical studies. *Am. J. Obstet. Gynecol.* 156, 1365–1374. doi: 10.1016/0002-9378(87)90002-0
- Benard, M., Straat, K., Omarsdottir, S., Leghmari, K., Bertrand, J., Davrinche, C., et al. (2014). Human cytomegalovirus infection induces leukotriene B4 and 5-lipoxygenase expression in human placentae and umbilical vein endothelial cells. *Placenta* 35, 345–350. doi: 10.1016/j.placenta.2014.03.022
- Benoist, G., Salomon, L. J., Mohlo, M., Suarez, B., Jacquemard, F., and Ville, Y. (2008). Cytomegalovirus-related fetal brain lesions: comparison between targeted ultrasound examination and magnetic resonance imaging. Ultrasound. Obstet. Gynecol. 32, 900–905. doi: 10.1002/uog.6129
- Blaschitz, A., Hutter, H., and Dohr, G. (2001). HLA Class I protein expression in the human placenta. *Early Preg.* 5, 67–69.
- Burton, G. J., and Fowden, A. L. (2015). The placenta: a multifaceted, transient organ. *Philos. Trans. R. Soc. Lond. B Biol. Sci.* 370:20140066. doi: 10.1098/rstb. 2014.0066
- 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. doi: 10.1002/rmv.655
- Chiarello, D. I., Salsoso, R., Toledo, F., Mate, A., Vazquez, C. M., and Sobrevia, L. (2018). Foetoplacental communication via extracellular vesicles in normal pregnancy and preeclampsia. *Mol. Aspects Med.* 60, 69–80. doi: 10.1016/j.mam. 2017.12.002
- Colombo, M., Raposo, G., and Thery, C. (2014). Biogenesis, secretion, and intercellular interactions of exosomes and other extracellular vesicles. Annu. Rev. Cell Dev. Biol. 30, 255–289. doi: 10.1146/annurev-cellbio-101512-12 2326
- Consortium, E. T., Deun, J. Van, Mestdagh, P., Agostinis, P., Akay, O., Anand, S., et al. (2017). EV-TRACK: transparent reporting and centralizing knowledge in extracellular vesicle research. *Nat. Methods* 14, 228–232.
- Cuffe, J. S. M., Holland, O., Salomon, C., Rice, G. E., and Perkins, A. V. (2017). Review: Placental derived biomarkers of pregnancy disorders. *Placenta* 54, 104–110. doi: 10.1016/j.placenta.2017.01.119
- Delorme-Axford, E., Donker, R. B., Mouillet, J. F., Chu, T., Bayer, A., Ouyang, Y., et al. (2013). Human placental trophoblasts confer viral resistance to recipient cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A* 110, 12048–12053. doi: 10.1073/pnas. 1304718110
- Dragovic, R. A., Collett, G. P., Hole, P., Ferguson, D. J., Redman, C. W., Sargent, I. L., et al. (2015). Isolation of syncytiotrophoblast microvesicles and exosomes and their characterisation by multicolour flow cytometry and fluorescence Nanoparticle Tracking Analysis. *Methods* 87, 64–74. doi: 10.1016/j.ymeth.2015. 03.028
- Fast, L. A., Mikulicic, S., Fritzen, A., Schwickert, J., Boukhallouk, F., Hochdorfer, D., et al. (2018). Inhibition of tetraspanin functions impairs human papillomavirus and cytomegalovirus infections. *Int. J. Mol. Sci.* 2018:19.
- Faye, A., Pornprasert, S., Dolcini, G., Ave, P., Taieb, J., Taupin, J. L., 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. doi: 10.1016/j.placenta. 2004.08.005
- Fitzgerald, W., Gomez-Lopez, N., Erez, O., Romero, R., and Margolis, L. (2018). Extracellular vesicles generated by placental tissues ex vivo: A transport system for immune mediators and growth factors. Am. J. Reprod. Immunol. 80:e12860. doi: 10.1111/aji.12860
- Gregory, A. L., Xu, G., Sotov, V., and Letarte, M. (2014). Review: the enigmatic role of endoglin in the placenta. *Placenta* 35(Suppl.), S93–S99.
- Grivel, J. C., and Margolis, L. (2009). Use of human tissue explants to study human infectious agents. Nat. Protoc. 4, 256–269. doi: 10.1038/nprot.2008.245
- Guerra, B., Simonazzi, G., Puccetti, C., Lanari, M., Farina, A., Lazzarotto, T., et al. (2008). Ultrasound prediction of symptomatic congenital cytomegalovirus infection. Am. J. Obstet. Gynecol. 198:380.

- Hamilton, S. T., Scott, G., Naing, Z., Iwasenko, J., Hall, B., Graf, N., et al. (2012). Human cytomegalovirus-induces cytokine changes in the placenta with implications for adverse pregnancy outcomes. *PLoS One* 7:e52899. doi: 10.1371/ journal.pone.0052899
- Herrera-Van Oostdam, A. S., Salgado-Bustamante, M., Lopez, J. A., Herrera-VanOostdam, D. A., and Lopez-Hernandez, Y. (2019). Placental exosomes viewed from an 'omics' perspective: implications for gestational diabetes biomarkers identification. *Biomark Med.* 13, 675–684. doi: 10.2217/bmm-2018-0468
- Higuchi, T., Fujiwara, H., Egawa, H., Sato, Y., Yoshioka, S., Tatsumi, K., et al. (2003). Cyclic AMP enhances the expression of an extravillous trophoblast marker, melanoma cell adhesion molecule, in choriocarcinoma cell JEG3 and human chorionic villous explant cultures. *Mol. Hum. Reprod* 9, 359–366. doi: 10.1093/molehr/gag044
- Hurbain, I., Romao, M., Bergam, P., Heiligenstein, X., and Raposo, G. (2017). Analyzing lysosome-related organelles by electron microscopy. *Methods Mol. Biol*, 1594, 43–71. doi: 10.1007/978-1-4939-6934-0_4
- Jin, J., and Menon, R. (2018). Placental exosomes: A proxy to understand pregnancy complications. Am. J. Reprod. Immunol, 79:e12788. doi: 10.1111/ aji.12788
- Kalluri, R., and LeBleu, V. S. (2020). The biology, function, and biomedical applications of exosomes. *Science* 2020:367.
- Kandzija, N., Zhang, W., Motta-Mejia, C., Mhlomi, V., McGowan-Downey, J., James, T., et al. (2019). Placental extracellular vesicles express active dipeptidyl peptidase IV; levels are increased in gestational diabetes mellitus. J. Extracell. Vesicles 8:1617000. doi: 10.1080/20013078.2019.1617000
- Kenneson, A., and Cannon, M. J. (2007). Review and meta-analysis of the epidemiology of congenital cytomegalovirus (CMV) infection. *Rev. Med. Virol.* 17, 253–276. doi: 10.1002/rmv.535
- Koliha, N., Wiencek, Y., Heider, U., Jungst, C., Kladt, N., Krauthauser, S., et al. (2016). A novel multiplex bead-based platform highlights the diversity of extracellular vesicles. J. Extracell. Vesicles 5:29975. doi: 10.3402/jev.v5.29975
- Kowal, J., Arras, G., Colombo, M., Jouve, M., Morath, J. P., Primdal-Bengtson, B., et al. (2016). Proteomic comparison defines novel markers to characterize heterogeneous populations of extracellular vesicle subtypes. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A* 113, E968–E977.
- Lanzieri, T. M., Kruszon-Moran, D., Amin, M. M., Bialek, S. R., Cannon, M. J., Carroll, M. D., et al. (2015). Seroprevalence of cytomegalovirus among children 1 to 5 years of age in the United States from the National Health and Nutrition Examination Survey of 2011 to 2012. *Clin. Vaccine Immunol.* 22, 245–247. doi: 10.1128/cvi.00697-14
- Lee, C. Q., Gardner, L., Turco, M., Zhao, N., Murray, M. J., Coleman, N., et al. (2016). What is trophoblast? a combination of criteria define human firsttrimester trophoblast. *Stem Cell Rep.* 6, 257–272. doi: 10.1016/j.stemcr.2016. 01.006
- Leruez-Ville, M., and Ville, Y. (2017). Fetal cytomegalovirus infection. Best Pract. Res. Clin. Obstet. Gynaecol. 38, 97–107.
- Lopez, H., Benard, M., Saint-Aubert, E., Baron, M., Martin, H., Saati, T. Al, 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. doi: 10.1016/j. placenta.2011.04.016
- Luo, S. S., Ishibashi, O., Ishikawa, G., Ishikawa, T., Katayama, A., Mishima, T., et al. (2009). Human villous trophoblasts express and secrete placenta-specific microRNAs into maternal circulation via exosomes. *Biol. Reprod.* 81, 717–729. doi: 10.1095/biolreprod.108.075481
- Lv, F. J., Tuan, R. S., Cheung, K. M., and Leung, V. Y. (2014). Concise review: the surface markers and identity of human mesenchymal stem cells. *Stem Cells* 32, 1408–1419. doi: 10.1002/stem.1681
- Malnou, C. E., Umlauf, D., Mouysset, M., and Cavaille, J. (2019). Imprinted MicroRNA gene clusters in the evolution, development, and functions of mammalian placenta. *Front. Genet.* 9:706. doi: 10.3389/fgene.2018.00706
- McNanley, T., and Woods, J. (2008). *Placental physiology. Glob. libr. women's med.* Available at: https://www.glowm.com/section-view/item/195#.YSjL0246_OQ
- Mengelle, C., Sandres-Saune, K., Mansuy, J. M., Hasle, C., Boineau, J., and Izopet, J. (2016). Performance of a completely automated system for monitoring CMV DNA in plasma. J. Clin. Virol. 79, 25–31. doi: 10.1016/j.jcv.2016. 03.024

Frontiers in Cell and Developmental Biology | www.frontiersin.org

- Miranda, J., Paules, C., Nair, S., Lai, A., Palma, C., Scholz-Romero, K., et al. (2018). Placental exosomes profile in maternal and fetal circulation in intrauterine growth restriction - Liquid biopsies to monitoring fetal growth. *Placenta* 64, 34–43. doi: 10.1016/j.placenta.2018.02.006
- Mitchell, M. D., Peiris, H. N., Kobayashi, M., Koh, Y. Q., Duncombe, G., Illanes, S. E., et al. (2015). Placental exosomes in normal and complicated pregnancy. *Am. J. Obstet. Gynecol.* 213, S173–S181.
- Montiel, J. F., Kaune, H., and Maliqueo, M. (2013). Maternal-fetal unit interactions and eutherian neocortical development and evolution. *Front. Neuroanat.* 7:22. doi: 10.3389/fnana.2013.00022
- Nagao, K., Zhu, J., Heneghan, M. B., Hanson, J. C., Morasso, M. I., Tessarollo, L., et al. (2009). Abnormal placental development and early embryonic lethality in EpCAM-null mice. *PLoS One* 4:e8543. doi: 10.1371/journal.pone.0008543
- O'Tierney-Ginn, P. F., and Lash, G. E. (2014). Beyond pregnancy: modulation of trophoblast invasion and its consequences for fetal growth and long-term children's health. J. Reprod. Immunol. 10, 37–42. doi: 10.1016/j.jri.2014.04.002
- Ouyang, Y., Bayer, A., Chu, T., Tyurin, V. A., Kagan, V. E., Morelli, A. E., et al. (2016). Isolation of human trophoblastic extracellular vesicles and characterization of their cargo and antiviral activity. *Placenta* 47, 86–95. doi: 10.1016/j.placenta.2016.09.008
- Pereira, L., Maidji, E., McDonagh, S., and Tabata, T. (2005). Insights into viral transmission at the uterine-placental interface. *Trends Microbiol.* 13, 164–174. doi: 10.1016/j.tim.2005.02.009
- Pereira, L., Tabata, T., Petitt, M., and Fang-Hoover, J. (2017). Congenital cytomegalovirus infection undermines early development and functions of the human placenta. *Placenta* 59(Suppl. 1), S8–S16.
- Polliotti, B. M., Abramowsky, C., Schwartz, D. A., Keesling, S. S., Lee, G. R., Caba, J., et al. (1995). Culture of first-trimester and full-term human chorionic villus explants: role of human chorionic gonadotropin and human placental lactogen as a viability index. *Early Preg.* 1, 270–280.
- Raposo, G., Nijman, H. W., Stoorvogel, W., Liejendekker, R., Harding, C. V., Melief, C. J., et al. (1996). B lymphocytes secrete antigen-presenting vesicles. *J. Exp. Med.* 183, 1161–1172. doi: 10.1084/jem.183.3.1161
- Rauwel, B., Mariame, B., Martin, H., Nielsen, R., Allart, S., Pipy, B., et al. (2010). Activation of peroxisome proliferator-activated receptor gamma by human cytomegalovirus for de novo replication impairs migration and invasiveness of cytotrophoblasts from early placentas. *J Virol* 84, 2946–2954. doi: 10.1128/jvi. 01779-09
- Rolland, M., Li, X., Sellier, Y., Martin, H., Perez-Berezo, T., Rauwel, B., et al. (2016). PPARgamma is activated during congenital cytomegalovirus infection and inhibits neuronogenesis from human neural stem cells. *PLoS Pathog.* 12:e1005547. doi: 10.1371/journal.ppat.1005547
- Sadovsky, Y., Ouyang, Y., Powell, J. S., Li, H., Mouillet, J. F., Morelli, A. E., et al. (2020). Placental small extracellular vesicles: current questions and investigative opportunities. *Placenta* 102, 34–38. doi: 10.1016/j.placenta.2020.03.002
- Salomon, C., and Rice, G. E. (2017). Role of exosomes in placental homeostasis and pregnancy disorders. *Prog. Mol. Biol. Transl. Sci.* 145, 163–179. doi: 10.1016/bs. pmbts.2016.12.006
- Salomon, C., Ryan, J., Sobrevia, L., Kobayashi, M., Ashman, K., Mitchell, M., et al. (2013). Exosomal signaling during hypoxia mediates microvascular endothelial cell migration and vasculogenesis. *PLoS One* 8:e68451. doi: 10.1371/journal. pone.0068451
- Salomon, C., Scholz-Romero, K., Sarker, S., Sweeney, E., Kobayashi, M., Correa, P., et al. (2016). Gestational diabetes mellitus is associated with changes in the concentration and bioactivity of placenta-derived exosomes in maternal circulation across gestation. *Diabetes* 65, 598–609. doi: 10.2337/db15-0966
- Salomon, C., Yee, S., Scholz-Romero, K., Kobayashi, M., Vaswani, K., Kvaskoff, D., et al. (2014). Extravillous trophoblast cells-derived exosomes promote vascular smooth muscle cell migration. *Front. Pharmacol.* 5:175. doi: 10.3389/fphar. 2014.00175
- Sammar, M., Siwetz, M., Meiri, H., Fleming, V., Altevogt, P., and Huppertz, B. (2017). Expression of CD24 and Siglec-10 in first trimester placenta: implications for immune tolerance at the fetal-maternal interface. *Histochem. Cell Biol.* 147, 565–574. doi: 10.1007/s00418-016-1531-7
- Sarker, S., Scholz-Romero, K., Perez, A., Illanes, S. E., Mitchell, M. D., Rice, G. E., et al. (2014). Placenta-derived exosomes continuously increase in maternal circulation over the first trimester of pregnancy. *J. Transl. Med.* 12:204. doi: 10.1186/1479-5876-12-204
- Silasi, M., Cardenas, I., Kwon, J. Y., Racicot, K., Aldo, P., and Mor, G. (2015). Viral infections during pregnancy. Am. J. Reprod Immunol. 73, 199–213.

- Stegmann, C., Rothemund, F., Sampaio, K. Laib, Adler, B., and Sinzger, C. (2019). The n terminus of human cytomegalovirus glycoprotein O is important for binding to the cellular receptor PDGFRalpha. J. Virol. 2019:93.
- Sturgeon, C. M., and McAllister, E. J. (1998). Analysis of hCG: dinical applications and assay requirements. Ann. Clin. Biochem. 35(Pt 4), 460–491. doi: 10.1177/ 000456329803500402
- Tabata, T., Petitt, M., Zydek, M., Fang-Hoover, J., Larocque, N., Tsuge, M., et al. (2015). Human cytomegalovirus infection interferes with the maintenance and differentiation of trophoblast progenitor cells of the human placenta. *J. Virol.* 89, 5134–5147. doi: 10.1128/jvi.03674-14
- Thery, C., Amigorena, S., Raposo, G., and Clayton, A. (2006). Isolation and characterization of exosomes from cell culture supernatants and biological fluids. *Curr. Protoc. Cell Biol.* 2006;322.
- Thery, C., Witwer, K. W., Aikawa, E., Alcaraz, M. J., Anderson, J. D., Andriantsitohaina, R., et al. (2018). Minimal information for studies of extracellular vesicles 2018 (MISEV2018): a position statement of the International Society for Extracellular Vesicles and update of the MISEV2014 guidelines. J. Extracell. Vesicles 7:1535750.
- Tong, M., and Chamley, L. W. (2018). Isolation and characterization of extracellular vesicles from ex vivo cultured human placental explants. *Methods Mol. Biol.* 1710, 117–129. doi: 10.1007/978-1-4939-7498-6_9
- Tong, M., Kleffmann, T., Pradhan, S., Johansson, C. L., DeSousa, J., Stone, P. R., et al. (2016). Proteomic characterization of macro-, micro- and nanoextracellular vesicles derived from the same first trimester placenta: relevance for feto-maternal communication. *Hum. Reprod.* 31, 687–699. doi: 10.1093/ humrep/dew004
- Turner, D. L., Korneev, D. V., Purdy, J. G., de Marco, A., and Mathias, R. A. (2020). The host exosome pathway underpins biogenesis of the human cytomegalovirus virion. *Elife* 2020:9.
- Uenaka, M., Morizane, M., Tanimura, K., Deguchi, M., Kanzawa, M., Itoh, T., et al. (2019). Histopathological analysis of placentas with congenital cytomegalovirus infection. *Placenta* 75, 62–67. doi: 10.1016/j.placenta.2019.01.003
- van Niel, G., D'Angelo, G., and Raposo, G. (2018). Shedding light on the cell biology of extracellular vesicles. Nat. Rev. Mol. Cell Biol. 19, 213–228. doi: 10.1038/nrm.2017.125
- Viswanathan, K., Verweij, M. C., John, N., Malouli, D., and Fruh, K. (2017). Quantitative membrane proteomics reveals a role for tetraspanin enriched microdomains during entry of human cytomegalovirus. *PLoS One* 12:e0187899. doi: 10.1371/journal.pone.0187899
- Wiklander, O. P. B., Bostancioglu, R. B., Welsh, J. A., Zickler, A. M., Murke, F., Corso, G., et al. (2018). Systematic methodological evaluation of a multiplex bead-based flow cytometry assay for detection of extracellular vesicle surface signatures. *Front. Immunol.* 9:1326. doi: 10.3389/fimmu.2018. 01326
- Wong, F. T. M., Lin, C., and Cox, B. J. (2019). Cellular systems biology identifies dynamic trophoblast populations in early human placentas. *Placenta* 76, 10–18. doi: 10.1016/j.placenta.2018.12.012
- Zicari, S., Arakelyan, A., Palomino, R. A. N., Fitzgerald, W., Vanpouille, C., Lebedeva, A., et al. (2018). Human cytomegalovirus-infected cells release extracellular vesicles that carry viral surface proteins. *Virology* 524, 97–105. doi: 10.1016/j.virol.2018.08.008

Conflict of Interest: The authors declare that the research was conducted in the absence of any commercial or financial relationships that could be construed as a potential conflict of interest.

Publisher's Note: All daims expressed in this article are solely those of the authors and do not necessarily represent those of their affiliated organizations, or those of the publisher, the editors and the reviewers. Any product that may be evaluated in this article, or claim that may be made by its manufacturer, is not guaranteed or endorsed by the publisher.

Copyright © 2021 Bergamelli, Martin, Bénard, Ausseil, Mansuy, Hurbain, Mouysset, Groussolles, Cartron, Tanguy le Gac, Moinard, Suberbielle, Izopet, Tscherning, Raposo, Gonzalez-Dunia, D'Angelo and Malnou. This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License (CC BY). The use, distribution or reproduction in other forums is permitted, provided the original author(s) and the copyright owner(s) are credited and that the original publication in this journal is cited, in accordance with accepted academic practice. No use, distribution or reproduction is permitted which does not comply with these terms.

Frontiers in Cell and Developmental Biology | www.frontiersin.org

September 2021 | Volume 9 | Article 689122

2.2. Perspectives de l'article «Human Cytomegalovirus infection changes the pattern of surface markers of small extracellular vesicles isolated form first trimester placental histocultures »

Comme décrit dans l'article présenté en première partie des résultats, l'étude des effets des sEV issues de placentas *ex vivo* permet de se rapprocher des conditions physiopathologiques réelles en addition des données concernant les sEV cellulaires. Nous y avons montré que, conformément à notre hypothèse, les sEV issues de placentas infectés *ex vivo* par le hCMV induisent une sensibilité plus importante des cellules souches neurales naïves à une future infection par le hCMV.

Concernant la suite de ce travail sur les sEV issues d'explants placentaires, nous souhaitons caractériser la composition en miARN de ces vésicules. En effet la description de la composition des sEV placentaires reste lacunaire (Bergamelli et al., 2021), et nous avons pour objectif d'identifier des miARN différentiellement exprimés au sein des sEV placentaires au cours de l'infection par le hCMV, à visée de développement de biomarqueurs non invasifs. Nous avons collecté des placentas de terme comparables, infectés ou non *in vitro* par le hCMV, et à partir desquels nous avons purifié des sEV afin de séquencer leur contenu en miARN. Comme décrit par Liu *et al.* le transcriptome des placentas précoce est variable en fonction du terme mais également du sexe de l'embryon (F. Liu et al., 2021). Nous souhaitons donc appliquer à terme la méthode décrite par Degrelle *et al.* qui permet à partir de débris issus d'IVG, de déterminer le sexe embryonnaire et ainsi pouvoir comparer des groupes de terme, de sexe et de profils d'infection similaires (Degrelle & Fournier, 2018).

3. Collection Biologique « Neuroplex »

Afin de valider nos résultats au plus proche de la physiopathologie réelle de l'infection congénitale par le hCMV j'ai constitué une collection biologique « Neuroplex » constituée d'échantillons biologiques de cas cliniques présentant une infection congénitale. En effet, les données obtenues sur cellules trophoblastiques ou explants placentaires *ex-vivo* restent parcellaires car éloignées de la vraie pathologie de l'infection congénitale à hCMV. Avoir à disposition des échantillons humains nous permet de valider nos données avec plus de pertinence clinique. Les protocoles de mise en place et de suivi d'une collection biologique sont fastidieux et longs, surtout quand les patientes d'intérêt sont peu fréquentes et que nous

cherchons à les suivre au cours de leur grossesse afin d'avoir un panel évolutif de certains échantillons biologiques. Dans ce contexte, j'ai débuté en 2018 ce projet de collection biologique et j'ai procédé au suivi du projet tout au long de mes 3 années de thèse (interactions avec les centres de ressources biologiques, élaboration des documents et des protocoles de suivi, informations aux équipes soignantes, suivi du parcours des patientes et gestion des prélèvements).

Ce biobanking « Neuroplex » consiste en la collecte d'échantillons de couples mèresfœtus, suivis à la maternité Paule de Viguier (CHU Toulouse Purpan) et présentant une infection congénitale à hCMV. En étroite collaboration avec les cliniciens, en particulier les Drs. M. Bénard et M. Groussolles et l'équipe de sages-femmes du CPDPN, nous avons inclus des patientes enceintes présentant une séroconversion, une réactivation ou une réinfection hCMV en cours de grossesse (Annexe 2). Au cours de leur suivi de grossesse, sans geste médical supplémentaire, nous récoltons des échantillons biologiques variés : sang maternel, liquide amniotique, et à l'accouchement des prélèvements de sang de cordon fœtal et de placenta (Annexe 3 et 4).

D'un point de vue réglementaire, l'étude est enregistrée au Centre de Ressources Biologiques Germethèque, au CECOS de la maternité Paule de Viguier, CHU Toulouse Purpan (BB-0033-00081) sous la déclaration numéro DC-2014-2202 et le numéro d'autorisation AC-2015-2350. Le comité de protection des personnes a été saisi directement par la Germethèque pour validation de l'étude. Chaque patiente majeure a été informée des objectifs de l'étude, ainsi que de ses droits de refus de participer et de retrait permanent, et a signé un consentement écrit (CPP.2.15.27). Les données cliniques associées, leur collecte et leur analyse sont également couvertes par l'accord numéro DC-2014-2202.

Le diagnostic d'infection à hCMV en cours de grossesse n'étant pas systématique, la découverte de séroconversion hCMV se fait souvent sur signes d'appel échographiques ou bien lors d'un dépistage chez une patiente présentant des facteurs de risque. Généralement les patientes sont donc incluses dans « Neuroplex » au moment du diagnostic, en fin de premier trimestre ou en cours de deuxième trimestre de grossesse. Dès leur inclusion, nous conservons un échantillon de sang maternel, ainsi que du liquide amniotique si une amniocentèse est prévue dans le cadre du soin. Si la patiente nécessite dans la cadre de son parcours de soins de grossesse habituel des prélèvements sanguins supplémentaires, nous conservons un aliquot à visée de recherche. Lors de l'accouchement, que cela soit un accouchement par voie basse ou une césarienne, une naissance vivante, une mort fœtale ou une interruption médicale de grossesse,

les sages-femmes et gynéco-obstétricien.ne.s présent.e.s collectent des morceaux de placenta ainsi que du sang de cordon fœtal. Les échantillons sont ensuite immédiatement traités avec une congélation à -80°C pour le placenta, et avec une centrifugation préalable pour les fluides (liquide amniotique, sang maternel et fœtal) afin de les dépléter en cellules et débris puis nous procédons à la congélation à -80°C.

La difficulté principale de la constitution de cette biobanque est le risque de perte de vue ou de défaut de suivi des patientes. En effet, les cas diagnostiqués sont peu fréquents et le suivi sur plusieurs mois des patientes entre le terme de leur diagnostic et le terme de leur accouchement peut conduire à les perdre de vue, d'autant plus quand elles sont suivies dans plusieurs structures médicales simultanément. Ce projet n'aurait pas été possible sans l'implication toutes les équipes médicales et paramédicales collaboratrices qui ont adhéré à ce protocole de recherche, et ce même si la pandémie de SARS-CoV-2 a complexifié les parcours de soin dans les maternités.

L'inclusion des patientes a débuté au premier trimestre 2020, avec une pause forcée au printemps 2020. En date du 17 novembre 2021, nous avons inclus 31 patientes en séroconversion ou réinfection hCMV en cours de grossesse. Sur ces 31 patientes, 3 sont en cours de grossesse et devraient accoucher à l'hiver 2021. Sur les 28 patientes restantes, nous disposons d'échantillonnage « complet » pour la moitié : c'est-à-dire sang maternel précoce, liquide amniotique, sang de cordon et placenta, et pour l'autre moitié d'échantillonnage « incomplet ». Toutefois, en fonction des questions biologiques posées, les échantillons provenant des patientes présentant un profil d'échantillonnage « incomplet » pourront bien sûr être intégrés aux analyses. Concernant l'inclusion des cas contrôles, nous attendons d'avoir le profil des patientes « cas » afin de pouvoir apparier au plus juste en fonction des termes, des pathologies associées et des types de prélèvement la sélection des cas « contrôles ».

A titre d'exemple, les données présentées dans la dernière partie de l'article « *Le Cytomégalovirus humain modifie la sécrétion et la composition des petites vésicules extracellulaires trophoblastiques, favorisant ainsi l'infection des cellules fætales receveuses »* concernant le potentiel pro-viral des sEV amniotiques ont été comparées à des sEV de liquide amniotique provenant d'une patiente hors contexte infectieux et métabolique à un terme proche de celui des cas. Cet appariement s'est fait a posteriori, de fait de l'impossibilité de prévoir l'évolution de la suite de la grossesse des « cas ».

Intérêts et perspectives de la collection biologique Neuroplex :

L'objectif principal de la collection biologique « Neuroplex » est d'avoir accès à des échantillons humains de couple mère-fœtus présentant une infection congénitale afin d'en étudier les sEV à visée de développement d'un biomarqueur.

L'intérêt d'avoir mis en place un biobanking prospectif est double : d'une part avoir accès à des échantillons humains précieux à des temps précoces de la grossesse et d'autre part permettre un traitement des échantillons spécifique pour une étude ultérieure des sEV, ce qui n'est pas fréquemment le cas dans les centres de ressources biologiques. Pour chaque couple mère-fœtus/nouveau-né nous récoltons également des données cliniques, en portant un soin particulier aux co-infections potentielles, aux maladies associées et aux lésions placentaires et/ou cérébrales présentes (Annexe 1).

A terme, la corrélation des données biologiques et des données cliniques nous permettra de regrouper les patientes entre trois catégories : séroconversion hCMV et atteintes fœtales/néonatales légères, séroconversion hCMV et atteintes fœtales/néonatales sévères et enfin groupe contrôle sans séroconversion hCMV en cours de grossesse. Au sein de ces trois groupes, l'objectif est de purifier les sEV et, en fonction des résultats de séquençage des miARN obtenus dans les sEV issues des modèles d'HIPEC et d'explants placentaires, rechercher spécifiquement des modifications d'expression de certains miR candidats du cluster C19MC (Cf Partie résultats I.2, expérimentations en cours).

Par ailleurs, l'accès à des échantillons humains permet d'augmenter la portée de nos résultats obtenus *in vitro*, en validant les effets observés avec des sEV issues de prélèvements de patientes présentant de vraies infections en cours de grossesse à hCMV comme décrit dans l'article présenté en première partie des résultats.

La mise en place de projet de biobanking comme « Neuroplex » nécessite de l'anticipation ainsi que des liens forts avec la clinique. Le faible nombre de cas ainsi que le nécessité de suivre les patientes tout au long de leur grossesse complexifie le suivi, mais permet à terme de disposer d'échantillons humains précieux, essentiels pour valider les résultats obtenus sur des modèles de laboratoire réductionnistes.

DISCUSSION ET PERSPECTIVES

DISCUSSION ET PERSPECTIVES

Les connaissances sur les EV placentaires restent partielles et leurs effets biologiques mal compris d'un point de vue mécanistique (Sadovsky et al., 2020). Notre travail de recherche a visé à comprendre les implications des sEV placentaires au cours des infections congénitales. Nous avons en parallèle développé deux projets de recherche : d'une part une étude des mécanismes impliqués dans l'infection congénitale par le hCMV, notamment concernant la contribution des sEV placentaires, et d'autre part l'analyse de ces sEV placentaires comme biomarqueurs potentiels. En effet, nos objectifs de recherche à moyen et long terme sont d'une part de mieux appréhender les sEV placentaires comme médiateurs biologiques, mais également de potentiellement développer à partir de ces sEV des biomarqueurs non invasifs de suivi des grossesses hCMV positives, comme cela a été proposé pour d'autres pathologies de la grossesse (Salomon et al., 2017). Ce travail de thèse a permis d'apporter un niveau de compréhension plus fin, notamment concernant l'impact des sEV placentaires sur la participation aux lésions fœtales au cours de l'infection congénitale par le hCMV via leur effet pro-viral. Malgré ces connaissances nouvelles, il demeure de nombreuses zones d'ombre, tant dans le domaine de l'analyse des sEV placentaires que dans l'étude de leurs impacts potentiels au cours de l'infection congénitale par le hCMV. Ces inconnues offrent de multiples axes de recherche, de nombreux développements technologiques possibles ainsi que des potentielles études précliniques assez excitantes.

<u>Comment les sEV trophoblastiques exercent leur rôle pro-viral au cours de l'infection</u> par le hCMV ?

Les sEV issues d'une cellule trophoblastique infectée par le hCMV présentent une composition modifiée : elles ont été chargées avec des molécules provenant de leur cellule d'origine dont le métabolisme a été détourné par le virus. Elles peuvent donc contenir à la fois des médiateurs d'origine virale ou bien d'origine cellulaire qui vont exercer des effets biologiques à distance notamment dans les cellules fœtales. Dans le cadre de l'étude protéomique réalisée sur les sEV d'HIPEC infectées ou non par le hCMV, nous avons montré que les sEV présentent en conditions d'infection un profil protéique modifié, potentiellement pro-viral et nous avons confirmé expérimentalement cet effet pro-viral sur différents types cellulaires (Cf. article « *Le Cytomégalovirus humain modifie la sécrétion et la composition des*

petites vésicules extracellulaires trophoblastiques, favorisant ainsi l'infection des cellules fœtales receveuses »).

Tout d'abord, la transmission par les sEV à des cellules receveuses de la protéine cellulaire Thy1, surexprimée dans les sEV en condition infectée, pourrait favoriser l'entrée du hCMV dans ces cellules receveuses. En effet, Li *et al.* ont décrit que Thy1 joue un rôle dans le processus d'entrée virale médié par la macropinocytose (Q. Li et al., 2016). Par ailleurs, en analysant les voies liées aux protéines cellulaires sur ou sous-exprimées en condition d'infection dans les sEV trophoblastiques, la voie la plus fortement modifiée est celle de l'autophagie, présentant un schéma théorique d'activation. Les sEV issues de cellules trophoblastiques pourraient donc "mimer" cet effet très précoce d'activation de l'autophagie retrouvée dans les étapes immédiates du cycle viral naturel (Chaumorcel et al., 2012). Cet effet d'activation très précoce de l'autophagie pourrait favoriser l'infection ultérieure dans les cellules receveuses.

D'autre part, les sEV issues d'HIPEC infectées par le hCMV à des temps précoces sont chargées avec 31 protéines virales, impliquées au cours du cycle naturel viral dans des mécanismes variés : transcription virale, évasion immunitaire, quiescence, structure... On retrouve notamment certaines protéines du tégument qui ont vocation à être relarguées dès la fusion virale afin d'exercer des effets immédiats aux étapes très précoces de l'infection. Par exemple, nous avons observé que les sEV trophoblastiques sont chargées avec les protéines pp65 et pp71, impliquées dans l'évasion immunitaire et la facilitation de la transcription virale très précoce (Kalejta, 2008). On y retrouve également IE1 et IE2, essentielles aux temps précoces de l'infection pour la transcription virale notamment (Kalejta, 2008; Paulus & Nevels, 2009). Ainsi, ce cargo protéique cellulaire et viral chargé dans les sEV trophoblastiques pourrait expliquer en partie l'effet pro-viral que nous avons observé dans des cellules fœtales naïves. En 2020, Streck et al. ont également montré un effet pro-viral des sEV issues de fibroblastes infectés par le hCMV sur des cellules naïves. Les auteurs ont spécifiquement examiné la présence de 5 protéines virales dans les sEV issues de cellules infectées (gB, gH, pp71, UL85 et MCP). Sur ces 5 protéines, 4 sont des protéines structurales. Les auteurs ont attribué à la présence de ces protéines l'effet proviral qu'ils ont observé (Streck et al., 2020). Dans notre étude protéomique nous avons réalisé une description de toutes les protéines virales identifiées : nous avons retrouvé les protéines gB, gH, pp71 et MCP mais pas la protéine de capside codée par UL85. Par comparaison avec l'étude de Streck et al. nous avons grâce à notre étude protéomique une vue plus globale des protéines virales présentes dans les sEV, et pas seulement concernant les protéines de structure ou d'enveloppe fréquemment utilisées pour monitorer la présence de virus. Par ailleurs, l'utilisation de modèles cellulaires (fibroblastes V.S trophoblastes) et de souches virales (VH/LE V.S AD169) différents pourrait expliquer certaines des variations retrouvées au cours de la comparaison des résultats de ces deux études. De même, le délai entre l'infection et l'analyse des sEV pourrait expliquer certaines différences dans les profils de composition des sEV. Récemment Turner *et al.* ont en effet analysé la composition de sEV issues de fibroblastes 5 jours après infection par le hCMV qui comportaient des facteurs favorisant l'évasion immunitaire, ce qui n'est pas retrouvé précocement dans l'étude de Streck *et al.* (Streck et al., 2020; Turner et al., 2020).

En addition des médiateurs protéiques, des miARN peuvent également être présents dans les sEV, notre équipe est actuellement en attente de l'analyse des résultats de séquençage des miARN présents dans les sEV d'HIPEC infectées ou non par le hCMV. Les sEV peuvent en effet délivrer à distance des ARN, dont des miARN, qui peuvent moduler la biologie des cellules réceptrices (O'Brien et al., 2020). Le placenta secrète notamment des sEV contenant des miARN du cluster C19MC qui exercent en conditions physiologiques un rôle antiviral (Ouyang et al., 2016a, 2021). Par exemple, au niveau placentaire, le miARN-517a-3p du C19MC exerce spécifiquement un effet antiviral anti hCMV (Hamilton et al., 2021). Au niveau des miARN retrouvés dans les sEV de cellules trophoblastiques infectées par le hCMV, nous pourrions retrouver une baisse de certains miARN cellulaires antiviraux, une augmentation de certains miARN qui pourraient expliquer l'effet proviral (d'origine cellulaire ou virale). Les effets de ces miARN seront par la suite analysés individuellement, tant sur le niveau de facilitation de l'infection que sur la biologie des cellules souches neurales.

Par quel(s) mécanisme(s) le hCMV modifie-t-il la sécrétion et la composition des sEV trophoblastiques et placentaires ?

L'infection par le hCMV modifie la sécrétion des sEV dans les cellules trophoblastiques de manière similaire à ce qui a été observé récemment par Sterck *et al.* dans des fibroblastes : les sEV sont plus nombreuses et présentent une plus petite taille relative (Streck et al., 2020).

L'impact de l'infection par le hCMV sur la sécrétion des sEV pourrait s'expliquer, au moins en partie, par les effets du virus sur le processus d'autophagie. Nous avons vu, au cours de notre étude protéomique, que la voie la plus significativement modifiée dans les sEV trophoblastiques au cours d'une infection par le hCMV était le terme « autophagie » avec un

profil global d'activation des processus de l'autophagie (analyse IPA). Comme décrit dans la littérature, le hCMV active l'autophagie aux temps très précoces de l'infection et inhibe l'autophagie aux temps plus tardifs avec notamment un effet d'optimisation de la production virale (Chaumorcel et al., 2012; Mouna et al., 2016; Taisne et al., 2019). Cette activation potentielle de l'autophagie médiée par les sEV trophoblastiques dans des cellules naïves pourrait renforcer l'activation de l'autophagie retrouvée précocement au cours d'un cycle viral classique et participer à l'effet pro-viral observé. Par ailleurs, les mécanismes plus tardifs d'inhibition de l'autophagie, médiés notamment par les protéines virales TRS1 et IRS1, pourraient avoir un impact sur les mécanismes de production et de sécrétion des sEV. En effet, les voies de biogénèse et de sécrétion des sEV et le processus d'autophagie partagent un certain nombre de médiateurs communs et de voies de signalisation (Fader et al., 2008; Salimi et al., 2020).

Afin d'analyser cette hypothèse, nous pourrions induire l'expression des protéines virales TRS1 ou IRS1 *via* des plasmides dans un modèle de cellules trophoblastiques ou fibroblastiques afin d'analyser en suivant les sEV, à la fois en termes de taux de production, de structure et de composition.

Le changement de composition des sEV trophoblastiques et placentaires au cours d'une infection hCMV, avec notamment des changements de charge en protéines virales et cellulaires, pourrait s'expliquer par une récupération non spécifique du contenu protéique cytoplasmique ou bien par un chargement spécifique de certaines molécules dans les sEV. Il serait donc intéressant de pouvoir monitorer la quantité ainsi que la distribution de ces protéines au sein des cellules sécrétrices.

Comme décrit dans la partie résultats I.2 / expérimentations en cours /, nous nous sommes également intéressées à la composition en miARN des sEV au cours de l'infection par le hCMV, ces résultats sont actuellement en cours d'analyse. S'il existe un profil d'expression différent entre les sEV issues de cellules trophoblastiques infectées ou non par le hCMV, cela pourrait nous éclairer sur les voies potentiellement modifiées par le hCMV dans les trophoblastes. Par ailleurs, nous avons réalisé des expériences préliminaires visant à caractériser la composition en lipides des sEV trophoblastiques, en condition infectée ou non. L'objectif était d'obtenir une cartographie de la composition en lipides qui pourrait expliquer certains des effets biologiques des sEV (notamment concernant les lipides pro-inflammatoires). Bien que nous ayons identifié des lipides au cours de cette analyse lipidomique, les seuils de détection étaient assez bas et ces limitations techniques ne permettaient pas d'analyser les modulations

retrouvées comme étant significatives. Il serait intéressant de poursuivre cette caractérisation, en collaboration avec des spécialistes des lipides, afin d'obtenir une description exhaustive du contenu des sEV et ainsi avoir une vue d'ensemble des molécules potentiellement impliquées dans la régulation des effets pro et antiviraux des sEV placentaires.

 <u>Au cours d'une infection congénitale à hCMV, est-ce que les sEV trophoblastiques,</u> placentaires et amniotiques, en addition de leur effet pro-viral, pourraient exercer d'autres rôles sur les cellules souches neurales ?

Des travaux antérieurs de l'équipe, auxquels j'ai participé en Master 2, ont montré que l'infection des cellules souches neurales par le hCMV inhibe la neuronogénèse via une activation de PPARy et diminue le potentiel de migration des NSC via la surexpression de LIS1 (Rolland et al.. 2016, 2021). Nous avons montré que les sEV trophoblastiques/placentaires/amniotiques jouent un rôle pro-viral dans les cellules souches neurales pour une future infection par le hCMV. Un axe intéressant d'étude qui sera abordée par mon équipe après mon départ consiste en l'étude des effets de ces sEV sur la biologie des cellules souches neurales, particulièrement sur leur capacité de prolifération, leur potentiel de différenciation ainsi que leurs capacités migratoires. Les méthodes à mettre en œuvre sont maitrisées au sein de l'équipe pour répondre à ces questions : induction spécifique de la différenciation des NSC en neurones ou en astrocytes et tests de migration de type « ORIS » (Rolland et al., 2016, 2021) Par ailleurs, en fonction des résultats du séquençage des miARN présents dans les sEV trophoblastiques, nous pourront analyser spécifiquement l'effet d'une surexpression des miARN viraux ou cellulaires les plus fortement surexprimés sur la fonction des NSC. Si les sEV issues de placentas infectés par le hCMV modulent la biologie des NSC, cela pourrait apporter un nouvel élément de compréhension des causes des lésions cérébrales liées à l'infection congénitale par le hCMV.

Quels sont les apports des modèles de placenta *ex vivo* dans l'étude des sEV au cours de pathologies infectieuses ?

Le passage de modèles cellulaires à des modèles tissulaires, issus de patientes et cultivés *ex vivo*, présente plusieurs avantages en termes de relevance physiopathologique. Tout d'abord, les histocultures permettent d'observer la réponse de l'organe (ou d'une portion de l'organe),

et donc des différents types cellulaires qui le composent. Par ailleurs, l'usage d'un modèle ex vivo permet d'analyser des réponses propres à des individus, avec une variabilité interindividuelle importante, et plus seulement des réplicats techniques : les effets observés, s'ils sont significatifs, sont donc plus représentatifs de la relevance biologique. Concernant la grossesse, le placenta est un organe évolutif, et de nombreuses pathologies gravidiques débutent très précocement dès le premier trimestre. A la différence des modèles de placenta mis en culture ex vivo après un accouchement à terme, notre modèle de placentas précoces permet de se placer à une période pertinente pour l'étude des effets de l'infection par le hCMV (plus l'infection congénitale est précoce, plus les lésions seront importantes). Par ailleurs, la durée de culture de certains explants permet d'observer l'impact de processus biologiques longs en dehors de phases actives (Bergamelli et al., 2021; Fitzgerald et al., 2018) alors que l'analyse des sEV produites sur un temps court ne permet pas une vision aussi globale. L'infection congénitale par le hCMV est un processus dynamique et évolutif : l'infection de cellules placentaires induit la production de néo-virions qui vont infecter d'autres cellules, qui vont servir d'hôte au virus pour la réalisation de son cycle réplicatif, ce processus qui se déroule sur plusieurs semaines conduit le fœtus à être au contact du virus de manière prolongée. On ne peut donc pas appliquer de système de culture ex vivo court aux processus infectieux qui nécessitent un temps d'infection long (Kandzija et al., 2019). On n'observe pas en effet une synchronisation des cycles viraux avec des points à 24h, 48h et 72h post infection, comme on peut le retrouver avec des modèles cellulaires (Q. Li et al., 2016; Streck et al., 2020). De plus, notre modèle de culture d'explants ex vivo sur une longue période est très adapté aux études de tous les facteurs pouvant impacter le fonctionnement placentaire au premier trimestre, que cela soit en termes de sécrétion d'EV ou d'autres médiateurs placentaires. Des thématiques malheureusement d'actualité comme l'impact sur la grossesse des polluants ou de certains perturbateurs endocriniens pourraient bénéficier de ce modèle d'histocultures placentaires afin d'évaluer leur impact au plus près des conditions physiopathologiques. En conclusion, les modèles placentaires cellulaires et histologiques sont complémentaires, et la combinaison des deux permet de combiner reproductibilité et relevance clinique.

Peut-on comparer les résultats obtenus sur les sEV issues de cellules trophoblastiques et d'histocultures placentaires ?

Dans le cadre de ce travail de thèse, nous avons étudié au cours d'une infection par le hCMV les sEV produites par des cellules trophoblastiques et par des explants placentaires de

premier trimestre. La sécrétion des sEV est augmentée lors de l'infection des cellules trophoblastiques mais cette augmentation n'est pas retrouvée dans la sécrétion des sEV par les histocultures placentaires. Concernant les protéines de ces sEV, notre étude reste limitée pour les sEV placentaires à l'expression de marqueurs de surface. Il ne semble pas y avoir de corrélation entre les protéines surexprimées dans les sEV au cours de l'infection des HIPEC avec les marqueurs de surface surexprimés sur les sEV de placentas infectés par le hCMV. Toutefois les deux techniques ayant permis de mettre en évidence ces résultats (protéomique et Macsplex caractérisation FACS) ne sont pas similaires. Nous avons réalisé un test Macsplex sur les deux types de sEV et les résultats ne concordent pas en totalité. Les différences retrouvées au cours de la comparaison de ces deux modèles pourraient s'expliquer par deux facteurs : tout d'abord le taux d'infection dans les explants placentaires est plus faible que dans les HIPEC, par ailleurs, on retrouve certainement un mécanisme de dilution des sEV issues des explants placentaires (différents types cellulaires présents qui sécrètent chacun des sEV). Afin de pouvoir comparer précisément la composition protéique de ces deux types de vésicules il serait nécessaire de réaliser une étude protéomique sur les sEV issues de placenta cultivés ex vivo, même si le taux d'infection plus faible retrouvé dans les explants pourrait limiter les conclusions de cette analyse comparative.

Quel est le devenir la collection biologique « Neuroplex » ? Quels sont les marqueurs candidats pour le développement des biomarqueurs pronostiques de suivi des grossesses hCMV positives dans les sEV ?

Le projet de biobanking Neuroplex vise à avoir accès à des prélèvements (sang maternel et fœtal, liquide amniotique et placenta) de couples mère-fœtus présentant une séroconversion hCMV en cours de grossesse. Les objectifs sont d'une part de disposer d'échantillons humains afin de valider nos résultats obtenus *in vitro*, et d'autre part de mettre en évidence des potentiels biomarqueurs pronostiques des lésions fœtales et néonatales de l'infection congénitale par le hCMV.

Concernant le premier objectif, l'accès à des prélèvements de liquide amniotique nous a permis de valider, sur un nombre réduit de patientes, que les sEV issues du liquide amniotique de patientes en séroconversion hCMV ou sans contexte infectieux n'exerçaient pas le même potentiel pro-viral sur des NSC. Cette validation sur échantillons humains est une vraie plusvalue en termes de significativité clinique. Nous avons fait l'hypothèse que l'effet pro-viral que nous avons retrouvé était lié aux sEV d'origine placentaire présentes dans le liquide amniotique (Dixon et al., 2018). Nous pourrions envisager de réaliser un tri sur les sEV issues du liquide amniotique afin de sélectionner uniquement celles d'origine placentaire afin d'objectiver l'origine de l'effet proviral. Toutefois, le fœtus baigne dans le liquide amniotique au contact de nombreuses annexes fœtales (placenta, chorion, membranes amniotiques...) qui sécrètent toutes des sEV présentant de nombreuses caractéristiques similaires, ce qui risque de compliquer la purification d'un seul sous type.

Concernant le deuxième objectif du biobanking de mettre en évidence des biomarqueurs potentiels, l'inclusion des cas contrôles vas pouvoir débuter en appariant avec les cas hCMV afin d'obtenir 3 groupes (pas de séroconversion, séroconversion hCMV avec lésions modérées et séroconversion hCMV avec lésions importantes). Nous souhaitons analyser les miARN contenus dans les sEV plasmatiques des patientes de ces trois groupes afin de mettre en évidence des différences potentielles qui pourrait donc être indicatives *a priori* de certains types de lésions, notamment neurosensorielles.

Dans ce contexte, les 46 miARN du cluster C19MC sont nos candidats préférentiels. Ils sont très fortement exprimés dans le placenta et exercent des rôles très variables, notamment antiviral (Hamilton et al., 2021; Malnou et al., 2019; Ouyang et al., 2021). Ces miARN circulent activement entre le versant maternel et fœtal (Chang et al., 2017).

Le screening de miARN sélectionnés du cluster C19MC a permis la mise au point de potentiels pronostics précoces (au premier trimestre de grossesse) pour des maladies « métaboliques » et multifactorielles de la grossesse : l'hypertension gravidique, la prééclampsie et le retard de croissance intra-utérin. Les auteurs ont noté que la valeur prédictive était plus importante en recherchant le niveau d'expression de ces miARN par PCR dans les sEV plasmatiques maternelles que dans le sérum total (Hromadnikova et al., 2019). Nous souhaitons développer à terme le même type d'étude concernant les miARN dans les sEV de patientes enceintes en séroconversion hCMV.

La notion de pronostic est intimement liée à celle de prévention. En France, à la différence de nombreux autres pays, les interruptions médicales de grossesse sont légales en cas d'atteintes fœtales très sévères non traitables au moment du diagnostic. Ceci laisse la possibilité aux parents de choisir la possibilité qui leur semble la plus adaptée pour l'accueil de leur enfant. La possibilité d'atteintes neurosensorielles modérées liées à une infection congénitale par le hCMV ne conduit pas à une proposition d'IMG de la part des membres de

l'équipe de soin. Dans la cadre de l'infection congénitale par le hCMV, le développement d'un marqueur pronostic n'a donc pas vocation à favoriser les interruptions de grossesse, les IMG se décidant déjà sur des atteintes sévères en imagerie donnant un contexte d'évolution très défavorable. Par contre, ce potentiel marqueur pronostic, non invasif et précoce pourrait surtout conduire à un suivi plus poussé et si nécessaire la mise en place de traitements précoces en période néonatale ou dans la petite enfance permettant de limiter les séquelles sensorielles et donc le niveau de handicap des enfants.

 <u>Est-ce que les sEV pourraient jouer un rôle au cours du développement fœtal, non</u> seulement en contexte de stress biologique lié à l'infection mais également dans le transfert trans-générationnel d'informations biologiques ?

Les 1000 premiers jours d'un enfant, qui comprennent ses stades embryonnaires, sa vie fœtale et ses premières années de vie sont essentiels pour l'établissement d'une bonne santé physique et psychologique. La santé, au sens non seulement d'absence de maladie mais également d'état d'équilibre tout au long de la vie de l'individu, prend ses sources très précocement dès le début de la grossesse (Barker, 2004). Indépendamment de la thématique biologique étudiée au cours du développement et de la grossesse, il convient d'intégrer les conséquences potentielles sur la mère, l'enfant mais également sur la descendance. En effet, une femme enceinte portant un fœtus de sexe féminin porte également les gamètes qui permettront le développement de son petit-enfant.

On considère souvent une infection comme une pathologie aigüe, or dans le cadre d'une infection congénitale l'embryon ou le fœtus baigne dans un cocktail de virus et de médiateurs modifiés par l'état de stress lié à l'état infectieux pendant une longue période. Le processus infectieux peut donc y être considéré comme un état de stress biologique chronique. Dans ce contexte, les sEV pourraient exercer un panel d'effets, y compris dans la transmission ou le maintien de cet état de stress biologique. En effet, la compréhension des impacts des sEV, notamment d'origine placentaire, sur le développement du fœtus reste parcellaire à part concernant quelques pathologies gravidiques bien décrites. Nous gagnerions à analyser et à comprendre les effets des sEV comme médiateurs essentiels de la communication maternofœtale en conditions physiologiques, ce qui pourrait nous apporter de nombreuses données sur leur participation à des maladies de la grossesse ou à des défauts de développement embryonnaire ou fœtal.

Récemment, Chan *et al.* ont montré dans un modèle murin que les sEV spermatiques produites par des mâles stressés induisaient dans la descendance des défauts de neurodéveloppement et une sensibilité aux stress accrue. Cet effet trans-générationnel de transfert de stress, décrit dans d'autres modèles, a ici été induit strictement par la mise en contact de sEV épididymaires de mâles stressés avec les spermatozoïdes ayant par la suite été utilisés pour la fécondation (J. C. Chan et al., 2020).

Sans tomber dans le déterminisme, les recherches actuelles en plein développement sur la transmission, l'empreinte parentale, le micro-chimérisme materno-fœtal et les effets transgénérationnels, pourraient peut-être apporter un éclairage supplémentaire concernant certaines pathologies à l'étiologie mal connue. Les rôles des sEV, d'origine maternelle, paternelle, placentaire ou fœtale restent majoritairement méconnus mais elles pourraient jouer des rôles variés, tant dans le maintien d'un équilibre physiopathologique en cours de grossesse que dans la transmission d'informations entre générations.

REFERENCES

- Alvarez-Erviti, L., Seow, Y., Yin, H., Betts, C., Lakhal, S., & Wood, M. J. A. (2011). Delivery of siRNA to the mouse brain by systemic injection of targeted exosomes. *Nature Biotechnology*, 29(4), 341-345. https://doi.org/10.1038/nbt.1807
- Arav-Boger, R. (2015). Strain Variation and disease severity in congenital CMV infection in search of a viral marker. *Infectious disease clinics of North America*, 29(3), 401-414. https://doi.org/10.1016/j.idc.2015.05.009
- Banks, W. A., Sharma, P., Bullock, K. M., Hansen, K. M., Ludwig, N., & Whiteside, T. L. (2020). Transport of Extracellular Vesicles across the Blood-Brain Barrier : Brain Pharmacokinetics and Effects of Inflammation. *International Journal of Molecular Sciences*, 21(12), 4407. https://doi.org/10.3390/ijms21124407
- Barker, D. J. P. (2004). The developmental origins of well-being. *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences, 359*(1449), 1359-1366. https://doi.org/10.1098/rstb.2004.1518
- Bello-Morales, R., Praena, B., de la Nuez, C., Rejas, M. T., Guerra, M., Galán-Ganga, M., Izquierdo, M., Calvo, V., Krummenacher, C., & López-Guerrero, J. A. (2018). Role of Microvesicles in the Spread of Herpes Simplex Virus 1 in Oligodendrocytic Cells. *Journal of Virology*, 92(10), e00088-18. https://doi.org/10.1128/JVI.00088-18
- Beltran, P. M. J., & Cristea, I. M. (2014). The life cycle and pathogenesis of human cytomegalovirus infection : Lessons from proteomics. *Expert review of proteomics*, 11(6), 697-711. https://doi.org/10.1586/14789450.2014.971116
- Belzile, J.-P., Stark, T. J., Yeo, G. W., & Spector, D. H. (2014). Human cytomegalovirus infection of human embryonic stem cell-derived primitive neural stem cells is restricted at several steps but leads to the persistence of viral DNA. *Journal of Virology*, 88(8), 4021-4039. https://doi.org/10.1128/JVI.03492-13
- Benard, M., Straat, K., Omarsdottir, S., Leghmari, K., Bertrand, J., Davrinche, C., Duga-Neulat, I., Söderberg-Nauclér, C., Rahbar, A., & Casper, C. (2014). Human cytomegalovirus infection induces leukotriene B4 and 5-lipoxygenase expression in human placentae and umbilical vein endothelial cells. *Placenta*, 35(6), 345-350. https://doi.org/10.1016/j.placenta.2014.03.022
- Benoist, G., Salomon, L. J., Jacquemard, F., Daffos, F., & Ville, Y. (2008). The prognostic value of ultrasound abnormalities and biological parameters in blood of fetuses infected with cytomegalovirus. *BJOG: An International Journal of Obstetrics & Gynaecology*, 115(7), 823-829. https://doi.org/10.1111/j.1471-0528.2008.01714.x
- Bergamelli, M., Martin, H., Bénard, M., Ausseil, J., Mansuy, J.-M., Hurbain, I., Mouysset, M., Groussolles, M., Cartron, G., Gac, Y. T. le, Moinard, N., Suberbielle, E., Izopet, J., Tscherning, C., Raposo, G., Gonzalez-Dunia, D., D'Angelo, G., & Malnou, C. E. (2020). Human cytomegalovirus infection changes the pattern of surface markers of small extracellular vesicles isolated from first trimester placental histocultures. *BioRxiv*, 2020.11.30.402693. https://doi.org/10.1101/2020.11.30.402693
- Bergamelli, M., Martin, H., Bénard, M., Ausseil, J., Mansuy, J.-M., Hurbain, I., Mouysset, M.,
 Groussolles, M., Cartron, G., Tanguy le Gac, Y., Moinard, N., Suberbielle, E., Izopet, J.,
 Tscherning, C., Raposo, G., Gonzalez-Dunia, D., D'Angelo, G., & Malnou, C. E. (2021).
 Human Cytomegalovirus Infection Changes the Pattern of Surface Markers of Small
 Extracellular Vesicles Isolated From First Trimester Placental Long-Term Histocultures.

Frontiers in Cell and Developmental Biology, 9, 2281. https://doi.org/10.3389/fcell.2021.689122

- Berger, E., Colosetti, P., Jalabert, A., Meugnier, E., Wiklander, O. P. B., Jouhet, J., Errazurig-Cerda, E., Chanon, S., Gupta, D., Rautureau, G. J. P., Geloen, A., El-Andaloussi, S., Panthu, B., Rieusset, J., & Rome, S. (2020). Use of Nanovesicles from Orange Juice to Reverse Diet-Induced Gut Modifications in Diet-Induced Obese Mice. *Molecular Therapy. Methods & Clinical Development*, 18, 880-892. https://doi.org/10.1016/j.omtm.2020.08.009
- Braggin, J. E., Child, S. J., & Geballe, A. P. (2016). Essential role of protein kinase R antagonism by TRS1 in human cytomegalovirus replication. *Virology*, 489, 75-85. https://doi.org/10.1016/j.virol.2015.11.032
- Brennan, K., Martin, K., FitzGerald, S. P., O'Sullivan, J., Wu, Y., Blanco, A., Richardson, C., & Mc Gee, M. M. (2020). A comparison of methods for the isolation and separation of extracellular vesicles from protein and lipid particles in human serum. *Scientific Reports*, 10(1), 1039. https://doi.org/10.1038/s41598-020-57497-7
- Britt, W. (2015). Controversies in the natural history of congenital human cytomegalovirus infection : The paradox of infection and disease in offspring of women with immunity prior to pregnancy. *Medical Microbiology and Immunology*, 204(3), 263-271. https://doi.org/10.1007/s00430-015-0399-9
- Cannon, M. J. (2009). Congenital cytomegalovirus (CMV) epidemiology and awareness. Journal of Clinical Virology: The Official Publication of the Pan American Society for Clinical Virology, 46 Suppl 4, S6-10. https://doi.org/10.1016/j.jcv.2009.09.002
- Cannon, M. J., Griffiths, P. D., Aston, V., & Rawlinson, W. D. (2014). Universal newborn screening for congenital CMV infection : What is the evidence of potential benefit? *Reviews in medical virology*, 24(5), 291-307. https://doi.org/10.1002/rmv.1790
- Cannon, M. J., Schmid, D. S., & Hyde, T. B. (2010). Review of cytomegalovirus seroprevalence and demographic characteristics associated with infection. *Reviews in Medical Virology*, 20(4), 202-213. https://doi.org/10.1002/rmv.655
- Chahar, H. S., Corsello, T., Kudlicki, A. S., Komaravelli, N., & Casola, A. (2018). Respiratory Syncytial Virus Infection Changes Cargo Composition of Exosome Released from Airway Epithelial Cells. *Scientific Reports*, 8(1), 387. https://doi.org/10.1038/s41598-017-18672-5
- Chan, G., Hemmings, D. G., Yurochko, A. D., & Guilbert, L. J. (2002). Human Cytomegalovirus-Caused Damage to Placental Trophoblasts Mediated by Immediate-Early Gene-Induced Tumor Necrosis Factor-α. *The American Journal of Pathology*, *161*(4), 1371-1381.
- Chan, J. C., Morgan, C. P., Adrian Leu, N., Shetty, A., Cisse, Y. M., Nugent, B. M., Morrison, K. E., Jašarević, E., Huang, W., Kanyuch, N., Rodgers, A. B., Bhanu, N. V., Berger, D. S., Garcia, B. A., Ament, S., Kane, M., Neill Epperson, C., & Bale, T. L. (2020). Reproductive tract extracellular vesicles are sufficient to transmit intergenerational stress and program neurodevelopment. *Nature Communications*, *11*(1), 1499. https://doi.org/10.1038/s41467-020-15305-w
- Chang, G., Mouillet, J.-F., Mishima, T., Chu, T., Sadovsky, E., Coyne, C. B., Parks, W. T., Surti, U., & Sadovsky, Y. (2017). Expression and trafficking of placental microRNAs at the feto-maternal interface. FASEB Journal: Official Publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology, 31(7), 2760-2770. https://doi.org/10.1096/fj.201601146R
- Chaumorcel, M., Lussignol, M., Mouna, L., Cavignac, Y., Fahie, K., Cotte-Laffitte, J., Geballe, A., Brune, W., Beau, I., Codogno, P., & Esclatine, A. (2012). The human cytomegalovirus protein TRS1 inhibits autophagy via its interaction with Beclin 1. *Journal of Virology*, 86(5), 2571-2584. https://doi.org/10.1128/JVI.05746-11

- Chaumorcel, M., Souquère, S., Pierron, G., Codogno, P., & Esclatine, A. (2008). Human cytomegalovirus controls a new autophagy-dependent cellular antiviral defense mechanism. *Autophagy*, 4(1), 46-53.
- Cheeran, M. C.-J., Lokensgard, J. R., & Schleiss, M. R. (2009). Neuropathogenesis of congenital cytomegalovirus infection: Disease mechanisms and prospects for intervention. *Clinical Microbiology Reviews*, 22(1), 99-126, Table of Contents. https://doi.org/10.1128/CMR.00023-08
- Collins-McMillen, D., Buehler, J., Peppenelli, M., & Goodrum, F. (2018). Molecular Determinants and the Regulation of Human Cytomegalovirus Latency and Reactivation. *Viruses*, *10*(8). https://doi.org/10.3390/v10080444
- Colombo, M., Raposo, G., & Théry, C. (2014). Biogenesis, secretion, and intercellular interactions of exosomes and other extracellular vesicles. *Annual Review of Cell and Developmental Biology*, 30, 255-289. https://doi.org/10.1146/annurev-cellbio-101512-122326
- Crenshaw, B. J., Gu, L., Sims, B., & Matthews, Q. L. (2018). Exosome Biogenesis and Biological Function in Response to Viral Infections. *The Open Virology Journal*, 12, 134-148. https://doi.org/10.2174/1874357901812010134
- Crough, T., & Khanna, R. (2009). Immunobiology of Human Cytomegalovirus: From Bench to Bedside. *Clinical Microbiology Reviews*, 22(1), 76-98. https://doi.org/10.1128/CMR.00034-08
- Czernek, L., & Düchler, M. (2020). Exosomes as Messengers Between Mother and Fetus in Pregnancy. *International Journal of Molecular Sciences*, 21(12), E4264. https://doi.org/10.3390/ijms21124264
- D'Anca, M., Fenoglio, C., Serpente, M., Arosio, B., Cesari, M., Scarpini, E. A., & Galimberti, D. (2019). Exosome Determinants of Physiological Aging and Age-Related Neurodegenerative Diseases. *Frontiers in Aging Neuroscience*, 0. https://doi.org/10.3389/fnagi.2019.00232
- Davison, A. J., Eberle, R., Ehlers, B., Hayward, G. S., McGeoch, D. J., Minson, A. C., Pellett, P. E., Roizman, B., Studdert, M. J., & Thiry, E. (2009). The Order Herpesvirales. *Archives of virology*, 154(1), 171-177. https://doi.org/10.1007/s00705-008-0278-4
- Degrelle, S. A., & Fournier, T. (2018). Fetal-sex determination of human placental tissues. *Placenta*, *61*, 103-105. https://doi.org/10.1016/j.placenta.2017.12.001
- Delorme-Axford, E., Donker, R. B., Mouillet, J.-F., Chu, T., Bayer, A., Ouyang, Y., Wang, T., Stolz, D. B., Sarkar, S. N., Morelli, A. E., Sadovsky, Y., & Coyne, C. B. (2013). Human placental trophoblasts confer viral resistance to recipient cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 110(29), 12048-12053. https://doi.org/10.1073/pnas.1304718110
- Diosi, P., Moldovan, E., & Tomescu, N. (1969). Latent cytomegalovirus infection in blood donors. British Medical Journal, 4(5684), 660-662. https://doi.org/10.1136/bmj.4.5684.660
- Dixon, C. L., Sheller-Miller, S., Saade, G. R., Fortunato, S. J., Lai, A., Palma, C., Guanzon, D., Salomon, C., & Menon, R. (2018). Amniotic Fluid Exosome Proteomic Profile Exhibits Unique Pathways of Term and Preterm Labor. *Endocrinology*, 159(5), 2229-2240. https://doi.org/10.1210/en.2018-00073
- Donker, R. B., Mouillet, J. F., Chu, T., Hubel, C. A., Stolz, D. B., Morelli, A. E., & Sadovsky, Y. (2012). The expression profile of C19MC microRNAs in primary human trophoblast cells and exosomes. *Molecular Human Reproduction*, 18(8), 417-424. https://doi.org/10.1093/molehr/gas013
- Doyle, L. M., & Wang, M. Z. (2019). Overview of Extracellular Vesicles, Their Origin, Composition, Purpose, and Methods for Exosome Isolation and Analysis. *Cells*, 8(7), 727. https://doi.org/10.3390/cells8070727

- Dumont, T. M. F., Mouillet, J.-F., Bayer, A., Gardner, C. L., Klimstra, W. B., Wolf, D. G., Yagel, S., Balmir, F., Binstock, A., Sanfilippo, J. S., Coyne, C. B., Larkin, J. C., & Sadovsky, Y. (2017). The expression level of C19MC miRNAs in early pregnancy and in response to viral infection. *Placenta*, *53*, 23-29. https://doi.org/10.1016/j.placenta.2017.03.011
- Dupont, L., & Reeves, M. B. (2016). Cytomegalovirus latency and reactivation : Recent insights into an age old problem. *Reviews in medical virology*, 26(2), 75-89. https://doi.org/10.1002/rmv.1862
- Ebert, B., & Rai, A. J. (2019). Isolation and Characterization of Amniotic Fluid-Derived Extracellular Vesicles for Biomarker Discovery. *Methods in Molecular Biology (Clifton, N.J.)*, 1885, 287-294. https://doi.org/10.1007/978-1-4939-8889-1_19
- Eisenfeld, L., Silver, H., McLaughlin, J., Klevjer-Anderson, P., Mayo, D., Anderson, J., Herson, V., Krause, P., Savidakis, J., Lazar, A., Rosenkrantz, T., & Pisciotto, P. (1992). Prevention of transfusion-associated cytomegalovirus infection in neonatal patients by the removal of white cells from blood. *Transfusion*, 32(3), 205-209. https://doi.org/10.1046/j.1537-2995.1992.32392213801.x
- Fader, C. M., Sánchez, D., Furlán, M., & Colombo, M. I. (2008). Induction of autophagy promotes fusion of multivesicular bodies with autophagic vacuoles in k562 cells. *Traffic (Copenhagen, Denmark)*, 9(2), 230-250. https://doi.org/10.1111/j.1600-0854.2007.00677.x
- Fast, L. A., Mikuličić, S., Fritzen, A., Schwickert, J., Boukhallouk, F., Hochdorfer, D., Sinzger, C., Suarez, H., Monk, P. N., Yáñez-Mó, M., Lieber, D., & Florin, L. (2018). Inhibition of Tetraspanin Functions Impairs Human Papillomavirus and Cytomegalovirus Infections. *International Journal of Molecular Sciences*, 19(10). https://doi.org/10.3390/ijms19103007
- Fisher, S., Genbacev, O., Maidji, E., & Pereira, L. (2000). Human cytomegalovirus infection of placental cytotrophoblasts in vitro and in utero : Implications for transmission and pathogenesis. *Journal* of Virology, 74(15), 6808-6820.
- Fitzgerald, W., Gomez-Lopez, N., Erez, O., Romero, R., & Margolis, L. (2018). Extracellular vesicles generated by placental tissues ex vivo : A transport system for immune mediators and growth factors. *American Journal of Reproductive Immunology (New York, N.Y.: 1989)*, 80(1), e12860. https://doi.org/10.1111/aji.12860
- Forman, M. S., Vaidya, D., Bolorunduro, O., Diener-West, M., Pass, R. F., & Arav-Boger, R. (2017). Cytomegalovirus Kinetics Following Primary Infection in Healthy Women. *The Journal of Infectious Diseases*, 215(10), 1523-1526. https://doi.org/10.1093/infdis/jix188
- Forte, E., Zhang, Z., Thorp, E. B., & Hummel, M. (2020). Cytomegalovirus Latency and Reactivation : An Intricate Interplay With the Host Immune Response. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*, 10. https://doi.org/10.3389/fcimb.2020.00130
- Fraile-Ramos, A., Cepeda, V., Elstak, E., & Sluijs, P. van der. (2010). Rab27a Is Required for Human
CytomegalovirusPLOSONE,5(12),e15318.https://doi.org/10.1371/journal.pone.0015318
- Frängsmyr, L., Baranov, V., Nagaeva, O., Stendahl, U., Kjellberg, L., & Mincheva-Nilsson, L. (2005). Cytoplasmic microvesicular form of Fas ligand in human early placenta : Switching the tissue immune privilege hypothesis from cellular to vesicular level. *Molecular Human Reproduction*, 11(1), 35-41. https://doi.org/10.1093/molehr/gah129
- Gabrielli, L., Bonasoni, M. P., Santini, D., Piccirilli, G., Chiereghin, A., Petrisli, E., Dolcetti, R., Guerra, B., Piccioli, M., Lanari, M., Landini, M. P., & Lazzarotto, T. (2012). Congenital cytomegalovirus infection : Patterns of fetal brain damage. *Clinical Microbiology and Infection*, 18(10), E419-E427. https://doi.org/10.1111/j.1469-0691.2012.03983.x
- Gandhi, M. K., & Khanna, R. (2004). Human cytomegalovirus : Clinical aspects, immune regulation, and emerging treatments. *The Lancet. Infectious Diseases*, 4(12), 725-738. https://doi.org/10.1016/S1473-3099(04)01202-2

- Gardner, T. J., & Tortorella, D. (2016). Virion Glycoprotein-Mediated Immune Evasion by Human Cytomegalovirus: A Sticky Virus Makes a Slick Getaway. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 80(3), 663-677. https://doi.org/10.1128/MMBR.00018-16
- Gatherer, D., Seirafian, S., Cunningham, C., Holton, M., Dargan, D. J., Baluchova, K., Hector, R. D., Galbraith, J., Herzyk, P., Wilkinson, G. W. G., & Davison, A. J. (2011). High-resolution human cytomegalovirus transcriptome. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 108(49), 19755-19760. https://doi.org/10.1073/pnas.1115861108
- Gkrania-Klotsas, E., Langenberg, C., Sharp, S. J., Luben, R., Khaw, K.-T., & Wareham, N. J. (2013). Seropositivity and higher immunoglobulin g antibody levels against cytomegalovirus are associated with mortality in the population-based European prospective investigation of Cancer-Norfolk cohort. *Clinical Infectious Diseases: An Official Publication of the Infectious Diseases Society of America*, 56(10), 1421-1427. https://doi.org/10.1093/cid/cit083
- Gombash Lampe, S. E., Kaspar, B. K., & Foust, K. D. (2014). Intravenous Injections in Neonatal Mice. Journal of Visualized Experiments : JoVE, 93. https://doi.org/10.3791/52037
- Goodrum, F. (2016). Human Cytomegalovirus Latency : Approaching the Gordian Knot. *Annual Review* of Virology, 3(1), 333-357. https://doi.org/10.1146/annurev-virology-110615-042422
- Gould, S. J., Booth, A. M., & Hildreth, J. E. K. (2003). The Trojan exosome hypothesis. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *100*(19), 10592-10597. https://doi.org/10.1073/pnas.1831413100
- Hamilton, S. T., Hahn, F., Sonntag, E., Marschall, M., & Rawlinson, W. D. (2021). A placental specific miRNA miR-517a-3p exerts anti-human cytomegalovirus activity. *Placenta*, *112*, 62-65. https://doi.org/10.1016/j.placenta.2021.06.013
- Handschuh, K., Guibourdenche, J., Tsatsaris, V., Guesnon, M., Laurendeau, I., Evain-Brion, D., & Fournier, T. (2007). Human Chorionic Gonadotropin Expression in Human Trophoblasts from Early Placenta : Comparative Study Between Villous and Extravillous Trophoblastic Cells. *Placenta*, 28(2), 175-184. https://doi.org/10.1016/j.placenta.2006.01.019
- Handsfield, H. H., Chandler, S. H., Caine, V. A., Meyers, J. D., Corey, L., Medeiros, E., & McDougall, J. K. (1985). Cytomegalovirus infection in sex partners : Evidence for sexual transmission. *The Journal of Infectious Diseases*, 151(2), 344-348. https://doi.org/10.1093/infdis/151.2.344
- Haraszti, R. A., Didiot, M.-C., Sapp, E., Leszyk, J., Shaffer, S. A., Rockwell, H. E., Gao, F., Narain, N. R., DiFiglia, M., Kiebish, M. A., Aronin, N., & Khvorova, A. (2016). High-resolution proteomic and lipidomic analysis of exosomes and microvesicles from different cell sources. *Journal of Extracellular Vesicles*, 5. https://doi.org/10.3402/jev.v5.32570
- Harding, C., Heuser, J., & Stahl, P. (1983). Receptor-mediated endocytosis of transferrin and recycling of the transferrin receptor in rat reticulocytes. *Journal of Cell Biology*, 97(2), 329-339. https://doi.org/10.1083/jcb.97.2.329
- Harding, C. V., Heuser, J. E., & Stahl, P. D. (2013). Exosomes : Looking back three decades and into the future. *Journal of Cell Biology*, 200(4), 367-371. https://doi.org/10.1083/jcb.201212113
- Hedlund, M., Stenqvist, A.-C., Nagaeva, O., Kjellberg, L., Wulff, M., Baranov, V., & Mincheva-Nilsson, L. (2009). Human placenta expresses and secretes NKG2D ligands via exosomes that down-modulate the cognate receptor expression: Evidence for immunosuppressive function. *Journal of Immunology (Baltimore, Md.: 1950)*, 183(1), 340-351. https://doi.org/10.4049/jimmunol.0803477
- Ho, M. (2007). The history of cytomegalovirus and its diseases. *Medical Microbiology and Immunology*, 197(2), 65-73. https://doi.org/10.1007/s00430-007-0066-x
- Hoen, E. N.-'t, Cremer, T., Gallo, R. C., & Margolis, L. B. (2016). Extracellular vesicles and viruses : Are they close relatives? *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 113(33), 9155-9161. https://doi.org/10.1073/pnas.1605146113

- Homman-Loudiyi, M., Hultenby, K., Britt, W., & Söderberg-Nauclér, C. (2003). Envelopment of Human Cytomegalovirus Occurs by Budding into Golgi-Derived Vacuole Compartments Positive for gB, Rab 3, Trans-Golgi Network 46, and Mannosidase II. *Journal of Virology*, 77(5), 3191-3203. https://doi.org/10.1128/JVI.77.5.3191-3203.2003
- Hromadnikova, I., Dvorakova, L., Kotlabova, K., & Krofta, L. (2019). The Prediction of Gestational Hypertension, Preeclampsia and Fetal Growth Restriction via the First Trimester Screening of Plasma Exosomal C19MC microRNAs. *International Journal of Molecular Sciences*, 20(12). https://doi.org/10.3390/ijms20122972
- International Committee on Taxonomy of Viruses (ICTV). (s. d.). International Committee on Taxonomy of Viruses (ICTV). Consulté 27 avril 2020, à l'adresse https://talk.ictvonline.org/
- Izco, M., Blesa, J., Schleef, M., Schmeer, M., Porcari, R., Al-Shawi, R., Ellmerich, S., de Toro, M., Gardiner, C., Seow, Y., Reinares-Sebastian, A., Forcen, R., Simons, J. P., Bellotti, V., Cooper, J. M., & Alvarez-Erviti, L. (2019). Systemic Exosomal Delivery of shRNA Minicircles Prevents Parkinsonian Pathology. *Molecular Therapy: The Journal of the American Society of Gene Therapy*, 27(12), 2111-2122. https://doi.org/10.1016/j.ymthe.2019.08.010
- Jeppesen, D. K., Fenix, A. M., Franklin, J. L., Higginbotham, J. N., Zhang, Q., Zimmerman, L. J., Liebler, D. C., Ping, J., Liu, Q., Evans, R., Fissell, W. H., Patton, J. G., Rome, L. H., Burnette, D. T., & Coffey, R. J. (2019). Reassessment of Exosome Composition. *Cell*, 177(2), 428-445.e18. https://doi.org/10.1016/j.cell.2019.02.029
- Jin, J., & Menon, R. (2018). Placental exosomes: A proxy to understand pregnancy complications. American Journal of Reproductive Immunology (New York, N.Y.: 1989), 79(5), e12788. https://doi.org/10.1111/aji.12788
- Kalejta, R. F. (2008). Tegument proteins of human cytomegalovirus. *Microbiology and Molecular Biology Reviews: MMBR*, 72(2), 249-265, table of contents. https://doi.org/10.1128/MMBR.00040-07
- Kalejta, R. F., & Albright, E. R. (2020). Expanding the Known Functional Repertoire of the Human Cytomegalovirus pp71 Protein. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*, 10. https://doi.org/10.3389/fcimb.2020.00095
- Kalluri, R., & LeBleu, V. S. (2020). The biology, function, and biomedical applications of exosomes. *Science*, *367*(6478). https://doi.org/10.1126/science.aau6977
- Kandzija, N., Zhang, W., Motta-Mejia, C., Mhlomi, V., McGowan-Downey, J., James, T., Cerdeira, A. S., Tannetta, D., Sargent, I., Redman, C. W., Bastie, C. C., & Vatish, M. (2019). Placental extracellular vesicles express active dipeptidyl peptidase IV; levels are increased in gestational diabetes mellitus. *Journal of Extracellular Vesicles*, 8(1), 1617000. https://doi.org/10.1080/20013078.2019.1617000
- Lanzieri, T. M., Dollard, S. C., Bialek, S. R., & Grosse, S. D. (2014). Systematic review of the birth prevalence of congenital cytomegalovirus infection in developing countries. *International Journal of Infectious Diseases: IJID: Official Publication of the International Society for Infectious Diseases*, 22, 44-48. https://doi.org/10.1016/j.ijid.2013.12.010
- Le Lay, S., Rome, S., Loyer, X., & Nieto, L. (2021). Adipocyte-derived extracellular vesicles in health and diseases: Nano-packages with vast biological properties. *FASEB BioAdvances*, *3*(6), 407-419. https://doi.org/10.1096/fba.2020-00147
- Leruez-Ville, M., Foulon, I., Pass, R., & Ville, Y. (2020). Cytomegalovirus infection during pregnancy : State of the science. *American Journal of Obstetrics and Gynecology*, 223(3), 330-349. https://doi.org/10.1016/j.ajog.2020.02.018
- Leruez-Ville, M., Ghout, I., Bussières, L., Stirnemann, J., Magny, J.-F., Couderc, S., Salomon, L. J., Guilleminot, T., Aegerter, P., Benoist, G., Winer, N., Picone, O., Jacquemard, F., & Ville, Y. (2016). In utero treatment of congenital cytomegalovirus infection with valacyclovir in a

multicenter, open-label, phase II study. *American Journal of Obstetrics and Gynecology*, 215(4), 462.e1-462.e10. https://doi.org/10.1016/j.ajog.2016.04.003

- Li, H., Pinilla-Macua, I., Ouyang, Y., Sadovsky, E., Kajiwara, K., Sorkin, A., & Sadovsky, Y. (2020). Internalization of trophoblastic small extracellular vesicles and detection of their miRNA cargo in P-bodies. *Journal of Extracellular Vesicles*, 9(1), 1812261. https://doi.org/10.1080/20013078.2020.1812261
- Li, Q., Fischer, E., & Cohen, J. I. (2016). Cell Surface THY-1 Contributes to Human Cytomegalovirus Entry via a Macropinocytosis-Like Process. *Journal of Virology*, *90*(21), 9766-9781. https://doi.org/10.1128/JVI.01092-16
- Liu, F., Simasotchi, C., Vibert, F., Zhu, W., Gil, S., Degrelle, S. A., & Fournier, T. (2021). Age and Sex-Related Changes in Human First-Trimester Placenta Transcriptome and Insights into Adaptative Responses to Increased Oxygen. *International Journal of Molecular Sciences*, 22(6), 2901. https://doi.org/10.3390/ijms22062901
- Liu, H., Kang, M., Wang, J., Blenkiron, C., Lee, A., Wise, M., Chamley, L., & Chen, Q. (2018). Estimation of the burden of human placental micro- and nano-vesicles extruded into the maternal blood from 8 to 12 weeks of gestation. *Placenta*, 72-73, 41-47. https://doi.org/10.1016/j.placenta.2018.10.009
- Liu, J., Zhu, L., Wang, J., Qiu, L., Chen, Y., Davis, R. E., & Cheng, G. (2019). Schistosoma japonicum extracellular vesicle miRNA cargo regulates host macrophage functions facilitating parasitism. *PLoS Pathogens*, 15(6), e1007817. https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1007817
- Lopez, H., Benard, M., Saint-Aubert, E., Baron, M., Martin, H., Al Saati, T., Plantavid, M., Duga-Neulat, I., Berrebi, A., Cristini, C., Arnaud, C., Davrinche, C., Davignon, J.-L., & Casper, C. (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(7), 522-530. https://doi.org/10.1016/j.placenta.2011.04.016
- Malnou, E. C., Umlauf, D., Mouysset, M., & Cavaillé, J. (2019). Imprinted MicroRNA Gene Clusters in the Evolution, Development, and Functions of Mammalian Placenta. *Frontiers in Genetics*, 9. https://doi.org/10.3389/fgene.2018.00706
- Manandhar, T., Hò, G.-G. T., Pump, W. C., Blasczyk, R., & Bade-Doeding, C. (2019). Battle between Host Immune Cellular Responses and HCMV Immune Evasion. *International Journal of Molecular Sciences*, 20(15), 3626. https://doi.org/10.3390/ijms20153626
- Margolis, L., & Sadovsky, Y. (2019). The biology of extracellular vesicles : The known unknowns. *PLOS Biology*, 17(7), e3000363. https://doi.org/10.1371/journal.pbio.3000363
- Marostica, G., Gelibter, S., Gironi, M., Nigro, A., & Furlan, R. (2021). Extracellular Vesicles in Neuroinflammation. Frontiers in Cell and Developmental Biology, 0. https://doi.org/10.3389/fcell.2020.623039
- Mathieu, M., Martin-Jaular, L., Lavieu, G., & Théry, C. (2019). Specificities of secretion and uptake of exosomes and other extracellular vesicles for cell-to-cell communication. *Nature Cell Biology*, 21(1), 9-17. https://doi.org/10.1038/s41556-018-0250-9
- Mathieu, M., Névo, N., Jouve, M., Valenzuela, J. I., Maurin, M., Verweij, F. J., Palmulli, R., Lankar, D., Dingli, F., Loew, D., Rubinstein, E., Boncompain, G., Perez, F., & Théry, C. (2021). Specificities of exosome versus small ectosome secretion revealed by live intracellular tracking of CD63 and CD9. *Nature Communications*, *12*(1), 4389. https://doi.org/10.1038/s41467-021-24384-2
- Mesdag, V., Salzet, M., & Vinatier, D. (2014). Le trophoblaste : Chef d'orchestre de la tolérance immunologique maternelle. *Journal de Gynécologie Obstétrique et Biologie de la Reproduction*, 43(9), 657-670. https://doi.org/10.1016/j.jgyn.2014.06.008

- Miranda, J., Paules, C., Nair, S., Lai, A., Palma, C., Scholz-Romero, K., Rice, G. E., Gratacos, E., Crispi, F., & Salomon, C. (2018). Placental exosomes profile in maternal and fetal circulation in intrauterine growth restriction—Liquid biopsies to monitoring fetal growth. *Placenta*, 64, 34-43. https://doi.org/10.1016/j.placenta.2018.02.006
- Mocarski Jr., E. S. (2007). Betaherpes viral genes and their functions. In A. Arvin, G. Campadelli-Fiume, E. Mocarski, P. S. Moore, B. Roizman, R. Whitley, & K. Yamanishi (Éds.), *Human Herpesviruses : Biology, Therapy, and Immunoprophylaxis*. Cambridge University Press. http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK47435/
- Monguió-Tortajada, M., Gálvez-Montón, C., Bayes-Genis, A., Roura, S., & Borràs, F. E. (2019). Extracellular vesicle isolation methods: Rising impact of size-exclusion chromatography. *Cellular and Molecular Life Sciences*, 76(12), 2369-2382. https://doi.org/10.1007/s00018-019-03071-y
- Mouna, L., Hernandez, E., Bonte, D., Brost, R., Amazit, L., Delgui, L. R., Brune, W., Geballe, A. P., Beau, I., & Esclatine, A. (2016). Analysis of the role of autophagy inhibition by two complementary human cytomegalovirus BECN1/Beclin 1-binding proteins. *Autophagy*, 12(2), 327-342. https://doi.org/10.1080/15548627.2015.1125071
- Nagao, K., Zhu, J., Heneghan, M. B., Hanson, J. C., Morasso, M. I., Tessarollo, L., Mackem, S., & Udey, M. C. (2009). Abnormal placental development and early embryonic lethality in EpCAMnull mice. *PloS One*, 4(12), e8543. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0008543
- Nair, S., Jayabalan, N., Guanzon, D., Palma, C., Scholz-Romero, K., Elfeky, O., Zuñiga, F., Ormazabal, V., Diaz, E., Rice, G. E., Duncombe, G., Jansson, T., McIntyre, H. D., Lappas, M., & Salomon, C. (2018). Human Placental Exosomes in Gestational Diabetes Mellitus Carry a Specific Set of miRNAs Associated with Skeletal Muscle Insulin Sensitivity. *Clinical Science (London, England: 1979)*. https://doi.org/10.1042/CS20180487
- Njue, A., Coyne, C., Margulis, A. V., Wang, D., Marks, M. A., Russell, K., Das, R., & Sinha, A. (2021). The Role of Congenital Cytomegalovirus Infection in Adverse Birth Outcomes : A Review of the Potential Mechanisms. *Viruses*, 13(1), 20. https://doi.org/10.3390/v13010020
- O'Brien, K., Breyne, K., Ughetto, S., Laurent, L. C., & Breakefield, X. O. (2020). RNA delivery by extracellular vesicles in mammalian cells and its applications. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 1-22. https://doi.org/10.1038/s41580-020-0251-y
- O'Tierney-Ginn, P. F., & Lash, G. E. (2014). Beyond pregnancy : Modulation of trophoblast invasion and its consequences for fetal growth and long-term children's health. *Journal of Reproductive Immunology*, *104-105*, 37-42. https://doi.org/10.1016/j.jri.2014.04.002
- Ouyang, Y., Bayer, A., Chu, T., Tyurin, V. A., Kagan, V. E., Morelli, A. E., Coyne, C. B., & Sadovsky, Y. (2016a). Isolation of human trophoblastic extracellular vesicles and characterization of their cargo and antiviral activity. *Placenta*, 47, 86-95. https://doi.org/10.1016/j.placenta.2016.09.008
- Ouyang, Y., Bayer, A., Chu, T., Tyurin, V. A., Kagan, V. E., Morelli, A. E., Coyne, C. B., & Sadovsky, Y. (2016b). Isolation of human trophoblastic extracellular vesicles and characterization of their cargo and antiviral activity. *Placenta*, 47, 86-95. https://doi.org/10.1016/j.placenta.2016.09.008
- Ouyang, Y., Mouillet, J.-F., Coyne, C. B., & Sadovsky, Y. (2014). Review: Placenta-specific microRNAs in exosomes - good things come in nano-packages. *Placenta*, 35 Suppl, S69-73. https://doi.org/10.1016/j.placenta.2013.11.002
- Ouyang, Y., Mouillet, J.-F., Sorkin, A., & Sadovsky, Y. (2021). Trophoblastic extracellular vesicles and viruses : Friends or foes? *American Journal of Reproductive Immunology (New York, N.Y.:* 1989), 85(2), e13345. https://doi.org/10.1111/aji.13345
- Palomino, R. A. Ñ., Vanpouille, C., Laghi, L., Parolin, C., Melikov, K., Backlund, P., Vitali, B., & Margolis, L. (2019). Extracellular vesicles from symbiotic vaginal lactobacilli inhibit HIV-1

infection of human tissues. *Nature Communications*, 10(1), 1-14. https://doi.org/10.1038/s41467-019-13468-9

- Paulus, C., & Nevels, M. (2009). The Human Cytomegalovirus Major Immediate-Early Proteins as Antagonists of Intrinsic and Innate Antiviral Host Responses. *Viruses*, 1(3), 760-779. https://doi.org/10.3390/v1030760
- Pavan, L., Tarrade, A., Hermouet, A., Delouis, C., Titeux, M., Vidaud, M., Thérond, P., Evain-Brion, D., & Fournier, T. (2003). Human invasive trophoblasts transformed with simian virus 40 provide a new tool to study the role of PPARgamma in cell invasion process. *Carcinogenesis*, 24(8), 1325-1336. https://doi.org/10.1093/carcin/bgg074
- Pegtel, D. M., Cosmopoulos, K., Thorley-Lawson, D. A., van Eijndhoven, M. A. J., Hopmans, E. S., Lindenberg, J. L., de Gruijl, T. D., Würdinger, T., & Middeldorp, J. M. (2010). Functional delivery of viral miRNAs via exosomes. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 107(14), 6328-6333. https://doi.org/10.1073/pnas.0914843107
- Pereira, L., Maidji, E., Fisher, S. J., McDonagh, S., & Tabata, T. (2007). HCMV persistence in the population: Potential transplacental transmission. In A. Arvin, G. Campadelli-Fiume, E. Mocarski, P. S. Moore, B. Roizman, R. Whitley, & K. Yamanishi (Éds.), *Human Herpesviruses : Biology, Therapy, and Immunoprophylaxis*. Cambridge University Press. http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK47391/
- Pillay, P., Maharaj, N., Moodley, J., & Mackraj, I. (2016). Placental exosomes and pre-eclampsia: Maternal circulating levels in normal pregnancies and, early and late onset pre-eclamptic pregnancies. *Placenta*, 46, 18-25. https://doi.org/10.1016/j.placenta.2016.08.078
- Pu, X., Ma, S., Gao, Y., Xu, T., Chang, P., & Dong, L. (2020). Mesenchymal Stem Cell-Derived Exosomes : Biological Function and Their Therapeutic Potential in Radiation Damage. *Cells*, 10(1), 42. https://doi.org/10.3390/cells10010042
- Ramakrishnaiah, V., Thumann, C., Fofana, I., Habersetzer, F., Pan, Q., de Ruiter, P. E., Willemsen, R., Demmers, J. A. A., Stalin Raj, V., Jenster, G., Kwekkeboom, J., Tilanus, H. W., Haagmans, B. L., Baumert, T. F., & van der Laan, L. J. W. (2013). Exosome-mediated transmission of hepatitis C virus between human hepatoma Huh7.5 cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *110*(32), 13109-13113. https://doi.org/10.1073/pnas.1221899110
- Raposo, G., Nijman, H. W., Stoorvogel, W., Liejendekker, R., Harding, C. V., Melief, C. J., & Geuze, H. J. (1996). B lymphocytes secrete antigen-presenting vesicles. *The Journal of Experimental Medicine*, 183(3), 1161-1172. https://doi.org/10.1084/jem.183.3.1161
- Rauwel, B., Mariamé, B., Martin, H., Nielsen, R., Allart, S., Pipy, B., Mandrup, S., Devignes, M. D., Evain-Brion, D., Fournier, T., & Davrinche, C. (2010). Activation of peroxisome proliferatoractivated receptor gamma by human cytomegalovirus for de novo replication impairs migration and invasiveness of cytotrophoblasts from early placentas. *Journal of Virology*, 84(6), 2946-2954. https://doi.org/10.1128/JVI.01779-09
- Reeves, M., & Sinclair, J. (2013). Regulation of human cytomegalovirus transcription in latency: Beyond the major immediate-early promoter. *Viruses*, 5(6), 1395-1413. https://doi.org/10.3390/v5061395
- Rolland, M., Li, X., Sellier, Y., Martin, H., Perez-Berezo, T., Rauwel, B., Benchoua, A., Bessières, B., Aziza, J., Cenac, N., Luo, M., Casper, C., Peschanski, M., Gonzalez-Dunia, D., Leruez-Ville, M., Davrinche, C., & Chavanas, S. (2016). PPARγ Is Activated during Congenital Cytomegalovirus Infection and Inhibits Neuronogenesis from Human Neural Stem Cells. *PLoS Pathogens*, *12*(4), e1005547. https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1005547
- Rolland, M., Martin, H., Bergamelli, M., Sellier, Y., Bessières, B., Aziza, J., Benchoua, A., Leruez-Ville, M., Gonzalez-Dunia, D., & Chavanas, S. (2021). Human cytomegalovirus infection is

associated with increased expression of the lissencephaly gene PAFAH1B1 encoding LIS1 in neural stem cells and congenitally infected brains. *The Journal of Pathology*, 254(1), 92-102. https://doi.org/10.1002/path.5640

- Ryckman, B. J., Jarvis, M. A., Drummond, D. D., Nelson, J. A., & Johnson, D. C. (2006). Human cytomegalovirus entry into epithelial and endothelial cells depends on genes UL128 to UL150 and occurs by endocytosis and low-pH fusion. *Journal of Virology*, 80(2), 710-722. https://doi.org/10.1128/JVI.80.2.710-722.2006
- Sabapatha, A., Gercel-Taylor, C., & Taylor, D. D. (2006). Specific isolation of placenta-derived exosomes from the circulation of pregnant women and their immunoregulatory consequences. *American Journal of Reproductive Immunology (New York, N.Y.: 1989)*, *56*(5-6), 345-355. https://doi.org/10.1111/j.1600-0897.2006.00435.x
- Sadovsky, Y., Ouyang, Y., Powell, J. S., Li, H., Mouillet, J.-F., Morelli, A. E., Sorkin, A., & Margolis, L. (2020). Placental small extracellular vesicles: Current questions and investigative opportunities. *Placenta*, 102, 34-38. https://doi.org/10.1016/j.placenta.2020.03.002
- Salimi, L., Akbari, A., Jabbari, N., Mojarad, B., Vahhabi, A., Szafert, S., Kalashani, S. A., Soraya, H., Nawaz, M., & Rezaie, J. (2020). Synergies in exosomes and autophagy pathways for cellular homeostasis and metastasis of tumor cells. *Cell & Bioscience*, 10(1), 64. https://doi.org/10.1186/s13578-020-00426-y
- Salomon, C., Guanzon, D., Scholz-Romero, K., Longo, S., Correa, P., Illanes, S. E., & Rice, G. E. (2017). Placental Exosomes as Early Biomarker of Preeclampsia : Potential Role of Exosomal MicroRNAs Across Gestation. *The Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism*, 102(9), 3182-3194. https://doi.org/10.1210/jc.2017-00672
- Salomon, C., Kobayashi, M., Ashman, K., Sobrevia, L., Mitchell, M. D., & Rice, G. E. (2013). Hypoxiainduced changes in the bioactivity of cytotrophoblast-derived exosomes. *PloS One*, 8(11), e79636. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0079636
- Sarker, S., Scholz-Romero, K., Perez, A., Illanes, S. E., Mitchell, M. D., Rice, G. E., & Salomon, C. (2014). Placenta-derived exosomes continuously increase in maternal circulation over the first trimester of pregnancy. *Journal of Translational Medicine*, 12, 204. https://doi.org/10.1186/1479-5876-12-204
- Shahar-Nissan, K., Pardo, J., Peled, O., Krause, I., Bilavsky, E., Wiznitzer, A., Hadar, E., & Amir, J. (2020). Valaciclovir to prevent vertical transmission of cytomegalovirus after maternal primary infection during pregnancy : A randomised, double-blind, placebo-controlled trial. *The Lancet*, 396(10253), 779-785. https://doi.org/10.1016/S0140-6736(20)31868-7
- Sheller-Miller, S., Choi, K., Choi, C., & Menon, R. (2019). Cyclic-recombinase-reporter mouse model to determine exosome communication and function during pregnancy. *American Journal of Obstetrics and Gynecology*, 221(5), 502.e1-502.e12. https://doi.org/10.1016/j.ajog.2019.06.010
- Sheller-Miller, S., Trivedi, J., Yellon, S. M., & Menon, R. (2019). Exosomes Cause Preterm Birth in Mice: Evidence for Paracrine Signaling in Pregnancy. *Scientific Reports*, 9(1), 1-18. https://doi.org/10.1038/s41598-018-37002-x
- Sinclair, J., & Sissons, P. (2006). Latency and reactivation of human cytomegalovirus. *The Journal of General Virology*, 87(Pt 7), 1763-1779. https://doi.org/10.1099/vir.0.81891-0
- Sinzger, C., Digel, M., & Jahn, G. (2008). Cytomegalovirus cell tropism. Current Topics in Microbiology and Immunology, 325, 63-83. https://doi.org/10.1007/978-3-540-77349-8_4
- Skog, J., Würdinger, T., van Rijn, S., Meijer, D. H., Gainche, L., Sena-Esteves, M., Curry, W. T., Carter, B. S., Krichevsky, A. M., & Breakefield, X. O. (2008). Glioblastoma microvesicles transport RNA and proteins that promote tumour growth and provide diagnostic biomarkers. *Nature Cell Biology*, *10*(12), 1470-1476. https://doi.org/10.1038/ncb1800

Staun-Ram, E., & Shalev, E. (2005). Human trophoblast function during the implantation process. *Reproductive Biology and Endocrinology*, *3*(1), 56. https://doi.org/10.1186/1477-7827-3-56

- Stenqvist, A.-C., Nagaeva, O., Baranov, V., & Mincheva-Nilsson, L. (2013). Exosomes secreted by human placenta carry functional Fas ligand and TRAIL molecules and convey apoptosis in activated immune cells, suggesting exosome-mediated immune privilege of the fetus. *Journal* of Immunology (Baltimore, Md.: 1950), 191(11), 5515-5523. https://doi.org/10.4049/jimmunol.1301885
- Stern-Ginossar, N., Weisburd, B., Michalski, A., Khanh Le, V. T., Hein, M. Y., Huang, S.-X., Ma, M., Shen, B., Qian, S.-B., Hengel, H., Mann, M., Ingolia, N. T., & Weissman, J. S. (2012). Decoding human cytomegalovirus. *Science (New York, N.Y.)*, 338(6110), 10.1126/science.1227919. https://doi.org/10.1126/science.1227919
- Streck, N. T., Zhao, Y., Sundstrom, J. M., & Buchkovich, N. J. (2020). Human Cytomegalovirus Utilizes Extracellular Vesicles To Enhance Virus Spread. *Journal of Virology*, 94(16), e00609-20. https://doi.org/10.1128/JVI.00609-20
- Stuffers, S., Sem Wegner, C., Stenmark, H., & Brech, A. (2009). Multivesicular endosome biogenesis in the absence of ESCRTs. *Traffic (Copenhagen, Denmark)*, 10(7), 925-937. https://doi.org/10.1111/j.1600-0854.2009.00920.x
- Suárez, N. M., Wilkie, G. S., Hage, E., Camiolo, S., Holton, M., Hughes, J., Maabar, M., Vattipally, S. B., Dhingra, A., Gompels, U. A., Wilkinson, G. W. G., Baldanti, F., Furione, M., Lilleri, D., Arossa, A., Ganzenmueller, T., Gerna, G., Hubáček, P., Schulz, T. F., ... Davison, A. J. (2019). Human Cytomegalovirus Genomes Sequenced Directly From Clinical Material: Variation, Multiple-Strain Infection, Recombination, and Gene Loss. *The Journal of Infectious Diseases*, 220(5), 781-791. https://doi.org/10.1093/infdis/jiz208
- Tabata, T., Petitt, M., Zydek, M., Fang-Hoover, J., Larocque, N., Tsuge, M., Gormley, M., Kauvar, L. M., & Pereira, L. (2015). Human Cytomegalovirus Infection Interferes with the Maintenance and Differentiation of Trophoblast Progenitor Cells of the Human Placenta. *Journal of Virology*, 89(9), 5134-5147. https://doi.org/10.1128/JVI.03674-14
- Taisne, C., Lussignol, M., Hernandez, E., Moris, A., Mouna, L., & Esclatine, A. (2019). Human cytomegalovirus hijacks the autophagic machinery and LC3 homologs in order to optimize cytoplasmic envelopment of mature infectious particles. *Scientific Reports*, 9(1), 1-13. https://doi.org/10.1038/s41598-019-41029-z
- Tandon, R., AuCoin, D. P., & Mocarski, E. S. (2009). Human cytomegalovirus exploits ESCRT machinery in the process of virion maturation. *Journal of Virology*, 83(20), 10797-10807. https://doi.org/10.1128/JVI.01093-09
- Théry, C., Duban, L., Segura, E., Véron, P., Lantz, O., & Amigorena, S. (2002). Indirect activation of naïve CD4+ T cells by dendritic cell-derived exosomes. *Nature Immunology*, 3(12), 1156-1162. https://doi.org/10.1038/ni854
- Théry, C., Witwer, K. W., Aikawa, E., Alcaraz, M. J., Anderson, J. D., Andriantsitohaina, R., Antoniou, A., Arab, T., Archer, F., Atkin-Smith, G. K., Ayre, D. C., Bach, J.-M., Bachurski, D., Baharvand, H., Balaj, L., Baldacchino, S., Bauer, N. N., Baxter, A. A., Bebawy, M., ... Zuba-Surma, E. K. (2018). Minimal information for studies of extracellular vesicles 2018 (MISEV2018): A position statement of the International Society for Extracellular Vesicles and update of the MISEV2014 guidelines. *Journal of Extracellular Vesicles*, 7(1), 1535750. https://doi.org/10.1080/20013078.2018.1535750
- Thomi, G., Surbek, D., Haesler, V., Joerger-Messerli, M., & Schoeberlein, A. (2019). Exosomes derived from umbilical cord mesenchymal stem cells reduce microglia-mediated neuroinflammation in perinatal brain injury. *Stem Cell Research & Therapy*, 10(1), 105. https://doi.org/10.1186/s13287-019-1207-z
- Tomtishen III, J. P. (2012). Human cytomegalovirus tegument proteins (pp65, pp71, pp150, pp28). *Virology Journal*, 9, 22. https://doi.org/10.1186/1743-422X-9-22
- Tong, M., Abrahams, V. M., & Chamley, L. W. (2018). Immunological effects of placental extracellular vesicles. *Immunology and Cell Biology*. https://doi.org/10.1111/imcb.12049
- Tong, M., Kleffmann, T., Pradhan, S., Johansson, C. L., DeSousa, J., Stone, P. R., James, J. L., Chen, Q., & Chamley, L. W. (2016). Proteomic characterization of macro-, micro- and nanoextracellular vesicles derived from the same first trimester placenta: Relevance for fetomaternal communication. *Human Reproduction (Oxford, England)*, 31(4), 687-699. https://doi.org/10.1093/humrep/dew004
- Turner, D. L., Korneev, D. V., Purdy, J. G., de Marco, A., & Mathias, R. A. (2020). The host exosome pathway underpins biogenesis of the human cytomegalovirus virion. *eLife*, 9, e58288. https://doi.org/10.7554/eLife.58288
- Uenaka, M., Morizane, M., Tanimura, K., Deguchi, M., Kanzawa, M., Itoh, T., & Yamada, H. (2019). Histopathological analysis of placentas with congenital cytomegalovirus infection. *Placenta*, 75, 62-67. https://doi.org/10.1016/j.placenta.2019.01.003
- Valadi, H., Ekström, K., Bossios, A., Sjöstrand, M., Lee, J. J., & Lötvall, J. O. (2007). Exosomemediated transfer of mRNAs and microRNAs is a novel mechanism of genetic exchange between cells. *Nature Cell Biology*, 9(6), 654-659. https://doi.org/10.1038/ncb1596
- Van Deun, J., Mestdagh, P., Agostinis, P., Akay, Ö., Anand, S., Anckaert, J., Martinez, Z. A., Baetens, T., Beghein, E., Bertier, L., Berx, G., Boere, J., Boukouris, S., Bremer, M., Buschmann, D., Byrd, J. B., Casert, C., Cheng, L., Cmoch, A., ... Hendrix, A. (2017). EV-TRACK : Transparent reporting and centralizing knowledge in extracellular vesicle research. *Nature Methods*, 14(3), 228-232. https://doi.org/10.1038/nmeth.4185
- Vanarsdall, A. L., & Johnson, D. C. (2012). Human cytomegalovirus entry into cells. Current opinion in virology, 2(1). https://doi.org/10.1016/j.coviro.2012.01.001
- Vargas, A., Zhou, S., Éthier-Chiasson, M., Flipo, D., Lafond, J., Gilbert, C., & Barbeau, B. (2014). Syncytin proteins incorporated in placenta exosomes are important for cell uptake and show variation in abundance in serum exosomes from patients with preeclampsia. FASEB Journal: Official Publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology, 28(8), 3703-3719. https://doi.org/10.1096/fj.13-239053
- Vauloup-Fellous, C., Picone, O., Cordier, A.-G., Parent-du-Châtelet, I., Senat, M.-V., Frydman, R., & Grangeot-Keros, L. (2009). Does hygiene counseling have an impact on the rate of CMV primary infection during pregnancy? Results of a 3-year prospective study in a French hospital. *Journal of Clinical Virology: The Official Publication of the Pan American Society for Clinical Virology, 46 Suppl 4*, S49-53. https://doi.org/10.1016/j.jcv.2009.09.003
- Viswanathan, K., Verweij, M. C., John, N., Malouli, D., & Früh, K. (2017). Quantitative membrane proteomics reveals a role for tetraspanin enriched microdomains during entry of human cytomegalovirus. *PloS One*, *12*(11), e0187899. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0187899
- Wilkinson, G. W. G., Davison, A. J., Tomasec, P., Fielding, C. A., Aicheler, R., Murrell, I., Seirafian, S., Wang, E. C. Y., Weekes, M., Lehner, P. J., Wilkie, G. S., & Stanton, R. J. (2015). Human cytomegalovirus : Taking the strain. *Medical Microbiology and Immunology*, 204(3), 273-284. https://doi.org/10.1007/s00430-015-0411-4
- Xu, J., Camfield, R., & Gorski, S. M. (2018). The interplay between exosomes and autophagy—Partners in crime. *Journal of Cell Science*, *131*(15). https://doi.org/10.1242/jcs.215210
- Yang, H., Ma, Q., Wang, Y., & Tang, Z. (2020). Clinical application of exosomes and circulating microRNAs in the diagnosis of pregnancy complications and foetal abnormalities. *Journal of Translational Medicine*, 18, 32. https://doi.org/10.1186/s12967-020-02227-w

- Yuan, D., Zhao, Y., Banks, W. A., Bullock, K. M., Haney, M., Batrakova, E., & Kabanov, A. V. (2017). Macrophage exosomes as natural nanocarriers for protein delivery to inflamed brain. *Biomaterials*, 142, 1-12. https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2017.07.011
- Zhang, H., Freitas, D., Kim, H. S., Fabijanic, K., Li, Z., Chen, H., Mark, M. T., Molina, H., Martin, A. B., Bojmar, L., Fang, J., Rampersaud, S., Hoshino, A., Matei, I., Kenific, C. M., Nakajima, M., Mutvei, A. P., Sansone, P., Buehring, W., ... Lyden, D. (2018). Identification of distinct nanoparticles and subsets of extracellular vesicles by asymmetric flow field-flow fractionation. *Nature Cell Biology*, 20(3), 332-343. https://doi.org/10.1038/s41556-018-0040-4
- Zhang, Q., Higginbotham, J. N., Jeppesen, D. K., Yang, Y.-P., Li, W., McKinley, E. T., Graves-Deal, R., Ping, J., Britain, C. M., Dorsett, K. A., Hartman, C. L., Ford, D. A., Allen, R. M., Vickers, K. C., Liu, Q., Franklin, J. L., Bellis, S. L., & Coffey, R. J. (2019). Transfer of Functional Cargo in Exomeres. *Cell Reports*, 27(3), 940-954.e6. https://doi.org/10.1016/j.celrep.2019.01.009
- Zhou, W., Woodson, M., Neupane, B., Bai, F., Sherman, M. B., Choi, K. H., Neelakanta, G., & Sultana, H. (2018). Exosomes serve as novel modes of tick-borne flavivirus transmission from arthropod to human cells and facilitates dissemination of viral RNA and proteins to the vertebrate neuronal cells. *PLoS Pathogens*, 14(1), e1006764. https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1006764
- Zicari, S., Arakelyan, A., Palomino, R. A. Ñ., Fitzgerald, W., Vanpouille, C., Lebedeva, A., Schmitt, A., Bomsel, M., Britt, W., & Margolis, L. (2018). Human cytomegalovirus-infected cells release extracellular vesicles that carry viral surface proteins. *Virology*, 524, 97-105. https://doi.org/10.1016/j.virol.2018.08.008
- Zijlstra, A., & Di Vizio, D. (2018). Size matters in nanoscale communication. *Nature cell biology*, 20(3), 228-230. https://doi.org/10.1038/s41556-018-0049-8

ANNEXES

1. Annexe 1 : Données cliniques « Neuroplex »

Identification	Année inclusion	Accouchement	Terme accouchement
	Nom patiente		Lieu accouchement
	Prénom patiente		Mode accouchement
	Numero dossier PDV		Mise en travail
	DDN		Complications accourtement
	Association		Prélévement commentement 3
	Matemité de PEC		Prelevement serum materner 2
	Maternite de l'ec		Prelevenient sang de cordon
	Maternite Acc		Prelevement placenta
	Laboratoire biologique		
	Cabinet Echographie	Nouveau-né	Poids
			Apgar
Antécédents	Gestité		pH cordon
	Parité		pH artériel
	Complications grossesses		pH veineux
	Maladie chronique		Réanimation (coap intub)
	Maladie infectieuses		Examen neurologique en SDN
	Maladia immuna / immunodensersion		examented on pique en son
	Are siner		Lieu d'hornitalization
	Apelanies		Ded d hospitalisation
-			PCK CMV unvaire
Grossesse actuelle	DDR		NFS
	DDG		Bilan hépatique
	Grossesse mono/bi		Bactério naissance
	Spontanée / FIV		ETF
	Grossesse suivie		Fond ceil
	Nombre consultations		Test auditifs
	Nombre échographies		TTT antiviral
	Hospitalisations		Durée TTT
			Porologie TTT
	Distribution and a		Prelevement univer
	Diabete gesta		Preleveniene unnes
	Pre-eclampsie		e del neur
	MAP	Enfant	SUM PDV
	Autre pathologie grossesse		Consultations
			Examen neurologique
	NFS		Séquelles neurosensorielles
	CRP		TTT antiviral
			Durée TTT
Infectieux	VIH		Posologie TTT
	Svohilis		
	Hepatite B	Enfant 3 mois	Examen clinique
	Hepatite C		Bilan audio
	Townsharmore		Rilen wertibuliere
	Rubeala		IPM cost estals
	Rubeole Parvovirus 819		INM post natale
	Zika	Enranc 6 mols	Examen clinique
	Grippe		Bilan audio
	Infection bacterienne		Bilan vestibuliare
	Autre pathologie infectieuse		IRM post natale
	Voyage récent		
		Enfant 9 mois	Examen clinique
Foetus	Poids / percentile		Bilan audio
	PAG/BCIU		Bilan vestibuliare
	Atteintes viscerales rein/toie/intestin		IBM post natale
	Attaintar SMC		him post notate
	Automotion and Automotions		Francisco attainen
	Autres mairormations	Enianc 1 an	Examen cinique
			Bilan audio
Suisi méritana CMM	Sérologies CMV		Bilan vestibuliare
sam specifique chiny	Charles in A		IRM post natale
	Serologie 1		
	Serologie 2	Enfant 1 an 6 mois	Examen clinique
	Avidité IgG		Bilan audio
	Terme estime de la seroconversion		Bilan vestibuliare
	Terme au diagonstic de séroconversion		IRM post natale
	Signes d'appel maternels		
	Modifications bilan hepatique	Contract 2 and	Evenes clisious
	Syndrome pseudo-grippal	crimanit 2 and	Dilan audio
	Amniocentese		alter autio
	PCR CMV LA		Blian vestibuliare
	Echographics envirializing		IRM post natale
	concernines specialisees	Questionnaire ASQU dévelo	Questionnaire ASQU developpement
1	Lx echo		
	IRM	Enfant 3 ans	Examen clinique
1	CR IRM		Bilan audio
	CR Anapath Foetopath		Bilan vestibuliare
1			IRM post natale
	Prélèvement sérum maternel 1		
1	Prélèvement LA	Enderth & arrow	Example distance
	Prévention Hyziéno CMV	evention Hypieno CMV	Examen cimque
		-	onen euclo
		1	BIND VESUDUINIE

2. Annexe 2 : Note d'information pour les patientes « Neuroplex »

Note d'information à destinations des patientes : étude Neuroplex

Bonjour Madame,

Votre médecin vous a proposé de participer à l'étude de recherche Neuroplex

Contexte et but de l'étude

Le Cytomégalovirus (CMV) est un virus qui peut infecter la femme enceinte et dans certains cas conduire à des atteintes du cerveau chez le bébé. Les mécanismes qui interviennent semblent différents selon les patients et les conséquences pour l'enfant et sa famille sont très variables.

Notre équipe est pluridisciplinaire. Elle comprend des chercheurs, des obstétriciens, ORL et pédiatres. Nous cherchons à comprendre pourquoi certains sont symptomatiques alors que d'autres ne le sont pas et travaillons pour améliorer à terme la prise en charge prénatale et néonatale.

Pour cela nous souhaitons valider nos résultats au plus près de la clinique et recueillir notamment différents échantillons biologiques.

Pratique

Toute femme enceinte peut participer à notre étude. Les femmes enceintes qui présentent une séroconversion CMV au cours de leur grossesse ainsi que des femmes enceintes sans infection virale.

Notre travail concerne différents types d'échantillons (placenta, morceau de cordon ombilical, sang...) mais ne nécessite pas de prélèvement supplémentaire. Tous les prélèvements se font dans le cadre du suivi normal de la grossesse.

Les données cliniques recueillies sont anonymes.

Consentement

Votre consentement est nécessaire, mais vous pouvez changer d'avis à tout moment (en informant votre médecin).

Toutes les informations détaillées et réglementaires sont précisées dans le document joint « consentement Germethèque ». L'étude est enregistrée et validée au CRB Germethèque Toulouse.

Pour toute question n'hésitez pas à demander des clarifications

Nous vous remercions par avance pour votre attention et votre participation

Contact : benard melinda@chu-toulouse.fr ou 05.34.55.84.75 Numéro d'enregistrement de l'étude au CRB Germethèque Toulouse : 20190606

INSERM 1291 Infinity - Equipe Physiopathologie des infections virales du système nerveux central adulte et en développement



3. Annexe 3 : Prise en charge des patientes « Neuroplex »



→ Inclusion et parcours de soin des patientes CMV+ en cours de grossesse (+ contrôles)



4. Annexe 4 : Check-liste de l'accouchement « Neuroplex »



Collection biologique NEUROPLEX CMV

Check list Accouchement Patiente incluse CMV+ ou cas contrôle

AVB ou césarienne		IMG	
	sang maternel à la perfusion : 1 tube EDTA (étiquette mère)	3 0	sang maternel à la perfusion : 1 tube EDTA (étiquette mère)
	sang de cordon : 1 tube EDTA (étiquette bébé)		sang foetal : 1 tube EDTA si possible au foeticide (2 étiquettes mère + noter sang foetal)
d'env dans pot mère	d'environ 1cm ³ chacun pris dans différentes zones: dans pot rouge stérile (étiquette		LA: 5 à 10 cc dans falcon 10 si possible (étiquette mère)
	merej	80	placenta: 4 morceaux d'environ 1cm ³ chacun pris dans différentes zones: dans pot rouge stérile (étiquette mère)

→ Allo 0627097144 (C.MaInou/laisser message) ou 57451 (M.Bénard) pour transfert Inserm

Merci pour votre participation !

5. Annexe 5 : Article "Human cytomegalovirus infection is associated with increased expression of the lissencephaly gene PAFAH1B1 encoding LIS1in neural stem cells and congenitally infected brains"

Au cours de mon stage de Master 2 réalisé au sein de l'équipe « Pathogénèse des infections virales du système nerveux central adulte et en développement » au Centre de physiopathologie de Toulouse Purpan je me suis intéressée à l'impact de l'infection par le hCMV sur la biologie des cellules souches neurales. Plus précisément, j'ai poursuivi le travail du Dr. M Rolland qui avait pendant sa thèse étudié l'impact de l'infection par le hCMV sur l'expression de la protéine LIS1 et l'impact fonctionnel sur la biologie des NSC. Ce travail a donné lieu a une publication : "Human cytomegalovirus infection is associated with increased expression of the lissencephaly gene PAFAH1B1 encoding LIS1in neural stem cells and congenitally infected brains" publié le 24 mars 2021 dans Journal of Pathology. Ce travail m'a permis de me familiariser avec les techniques de culture de cellules souches et de microscopie qui ont été mises à profit au cours de ma thèse.

Journal of Pathology J Pathol May 2021; **254:** 92–102 Published online 24 March 2021 in Wiley Online Library (wileyonlinelibrary.com) DOI: 10.1002/path.5640

Human cytomegalovirus infection is associated with increased expression of the lissencephaly gene *PAFAH1B1* encoding LIS1 in neural stem cells and congenitally infected brains

Maude Rolland¹[†][©], Hélène Martin¹, Mathilde Bergamelli¹[©], Yann Sellier^{2,3}, Bettina Bessières^{2,3}, Jacqueline Aziza⁴, Alexandra Benchoua⁵[©], Marianne Leruez-Ville^{2,3}, Daniel Gonzalez-Dunia¹*[®] and Stéphane Chavanas^{1**}[®]

¹ Centre for Pathophysiology Toulouse-Purpan (CPTP), INSERM, CNRS, University of Toulouse, Toulouse, France

² Hôpital Necker-Enfants Malades, Assistance Publique-Hôpitaux de Paris, Paris, France

³ Université Paris Descartes, Paris, France

⁴ Département d'Anatomie Pathologique, IUCT-Oncopôle Toulouse, Toulouse, France

⁵ CECS, I-STEM, AFM, Corbeil-Essonnes, France

*Correspondence to: S Chavanas, Toulouse NeuroImaging Centre (TONIC), UMR1214, INSERM, University of Toulouse, 31024, Toulouse, France. E-mail: stephane.chavanas@inserm.fr; or D Gonzalez-Dunia, Centre for Pathophysiology Toulouse-Purpan (CPTP), INSERM, CNRS, University of Toulouse, 31024, Toulouse, France. E-mail: daniel.dunia@inserm.fr

[†]Current address: Laboratory of Molecular Immunology & Signal Transduction, GIGA Institute, University of Liège, 4000, Liège, Belgium [‡]Current address: Toulouse NeuroImaging Centre (TONIC), UMR1214, INSERM, University of Toulouse, 31024, Toulouse, France.

Abstract

Congenital infection of the central nervous system by human cytomegalovirus (HCMV) is a leading cause of permanent sequelae, including mental retardation or neurodevelopmental abnormalities. The most severe complications include smooth brain or polymicrogyria, which are both indicative of abnormal migration of neural cells, although the underlying mechanisms remain to be determined. To gain better insight on the pathogenesis of such sequelae, we assessed the expression levels of a set of neurogenesis-related genes, using HCMV-infected human neural stem cells derived from embryonic stem cells (NSCs). Among the 84 genes tested, we found dramatically increased expression of the gene PAFAH1B1, encoding LIS1 (lissencephaly-1), in HCMV-infected versus uninfected NSCs. Consistent with these findings, western blotting and immunofluorescence analyses confirmed the increased levels of LIS1 in HCMV-infected NSCs at the protein level. We next assessed the migratory abilities of HCMV-infected NSCs and observed that infection strongly impaired the migration of NSCs, without detectable effect on their proliferation. Moreover, we observed increased immunostaining for LIS1 in brains of congenitally infected fetuses, but not in control samples, highlighting the clinical relevance of our findings. Of note, PAFAH1B1 mutations (resulting in either haploinsufficiency or gain of function) are primary causes of hereditary neurodevelopmental diseases. Notably, mutations resulting in PAFAH1B1 haploinsufficiency cause classic lissencephaly. Taken together, our findings suggest that PAFAH1B1 is a critical target of HCMV infection. They also shine a new light on the pathophysiological basis of the neurological outcomes of congenital HCMV infection, by suggesting that defective neural cell migration might contribute to the pathogenesis of the neurodevelopmental sequelae of infection.

© 2021 The Pathological Society of Great Britain and Ireland. Published by John Wiley & Sons, Ltd.

Keywords: cytomegalovirus; LIS1; PAFAH1B1; DCX; congenital infection; neuronal migration

Received 17 January 2020; Revised 2 February 2021; Accepted 5 February 2021

No conflicts of interest were declared.

Introduction

Human cytomegalovirus (HCMV) is a beta herpesvirus with a worldwide distribution and an estimated global seroprevalence of 83% in the general population [1]. Congenital HCMV infection of the central nervous system is a leading cause of permanent sequelae (0.1–0.2% of all live births) [2].

More specifically, 10% of congenitally infected newborns are symptomatic at birth [2]. Most of them

© 2021 The Pathological Society of Great Britain and Ireland. Published by John Wiley & Sons, Ltd. www.pathsoc.org (60–90%) and 10–15% of those with asymptomatic infection develop one or more long-term neurological sequelae, such as mental retardation, psychomotor retardation, sensorineural hearing or vision loss, or cerebral palsies [2,3].The most severely affected cases show brain development abnormalities such as lissencephaly or polymicrogyria [3]. A retrospective review reported that 10 out of 15 (66%) infants congenitally infected by HCMV showed polymicrogyria or abnormal gyral patterns [3,4]. Lissencephalic brains are characterised

Increased PAFAH1B1-LIS1 in congenital cytomegalovirus infection

by a smooth surface, whereas excessive abundance of gyri is found in polymicrogyria. These features are indicative of abnormal migration of neural cells (reviewed in refs 5 and 6), as observed in hereditary lissencephalies. Hereditary lissencephalies are monogenic disorders that show considerable clinical, genetic, and allelic heterogeneity, but which, however, are all characterised by defective neuronal migration during development [7]. Indeed, the sequential and finely synchronised migration of neural progenitors, radial glia cells, and neurons are all critical events for proper brain development [5,6].

Direct infection of neural progenitor cells by HCMV in the developing brain plausibly contributes to the neurological sequelae due to HCMV congenital infection [8–11]. In particular, HCMV infection of neural progenitors was found to perturb their self-renewal and polarisation [12], apoptosis [13], or differentiation [8,10,12–14]. To date, however, no evidence has been reported showing that HCMV infection indeed affects neural cell migration in the developing brain [15].

In this study, we assessed the abnormally expressed genes in HCMV-infected human neural stem cells derived from embryonic stem cells (NSCs) and found that infection causes abnormal expression of *PAFAH1B1*, the principal causative gene for hereditary lissencephalies.

Materials and methods

Ethics statement

Use of NSCs was approved by the French regulatory authorities (Agence de la Biomédecine, # SASB092 0178S). Collection of brain histological samples was coordinated by Necker Hospital, AP-HP (Assistance Publique – Hôpitaux de Paris, Agence de la Biomédecine, # PFS-15009). Written informed consent was obtained from all study participants prior to sample collection. All samples were anonymised.

Cells, viruses, and reagents

NSCs, human immortalised fibroblast MRC-5 cells, and human invasive proliferative extravillous cytotrophoblast (HIPEC) cells were grown in vitro as detailed elsewhere [11,16]. In brief, NSCs were seeded at 100 000 cells/cm² and maintained in growth medium consisting of DMEM/F12/Neurobasal medium (Life Technologies, Carlsbad, CA, USA) mixed at a ratio of 1/1/2 (v/v/v) in the presence of N2 and B27 supplements (Life Technologies), FGF2 (10 ng/ml), EGF (10 ng/ml), and BDNF (20 ng/ml), all from Peprotech, Rocky Hill, NJ, USA. Culture supports were first coated using 0.05% polyornithine (PO) (Sigma, St Louis, MO, USA), followed by mouse laminin (1 µg/cm²) (Roche, Basel, Switzerland), both diluted in PBS. NSC cultures were checked for the absence of mycoplasma (Plasmotest; Invivogen, Toulouse, France). The MRC-5 line (CCL171; ATCC, Manassas, VA, USA) was cultured in DMEM containing 10% bovine calf serum (Life Technologies). The

© 2021 The Pathological Society of Great Britain and Ireland. Published by John Wiley & Sons, Ltd. www.pathsoc.org HIPEC line (a gift from T Fournier, INSERM UMR-S1139, Paris Descartes University, Paris, France) was cultured in DMEM/F12 (1/1), supplemented with 10% bovine calf serum.

We used the VHL/E HCMV strain (a gift from C Sinzger, Ulm, Germany) at low passage (<8) of amplification in MRC-5 cells and the AD169 HCMV strain (ATCC VR538). Preparation and titration of viral stocks and UV irradiation of viral inoculums were as detailed elsewhere [11]. Titration of viral suspensions was performed by immunofluorescence analysis on MRC-5 cells 24 h postinfection, using an antibody against HCMV immediateearly antigen (IE). We used primary antibodies specific to IE (mouse monoclonal; bioMérieux, Marcy l'Etoile, France), LIS1 (rabbit polyclonal, ab2607; Abcam, Cambridge, UK), DCX (rabbit polyclonal, ab18723; Abcam), Ki-67 (rabbit monoclonal; Merck Life Science, Dorset, UK), and alpha-tubulin (rabbit monoclonal, 11H10; Cell Signaling Technology, Leiden, The Netherlands). Secondary antibodies were conjugated either with horseradish peroxidase (Promega, Madison, WI, USA) for westernblot assays and immunohistochemistry (IHC) or with Alexa-488, -555 or -633 fluorophores (Life Technologies) for immunofluorescence analyses.

mRNA analysis

NSCs were infected at a multiplicity of infection (MOI) of 10 using the AD169 or VHL/E strains or left uninfected and harvested 72 h post-infection (pi). Total RNA was extracted from actively growing NSCs (i.e. at approximately 75% confluency) using Trizol (Life Technologies) according to the supplier's recommendations. Ten micrograms of RNA was reverse-transcribed in the presence of oligo-dT using Superscript III reverse transcriptase (Life Technologies). A first screen was per-formed using the RT² Profiler Neurogenesis kit (Qiagen, Hilden, Germany) according to the supplier's recommendations. Next, quantitative real-time PCR (qPCR) assays were performed as devised elsewhere [11] using Takyon qPCR mastermix (Eurogentec, Liège, Belgium), oligonucleotide probes (Qiagen) specific to PAFAH1B1 and RPLP0 (ribosomal protein, large, P0), as a reference gene, and an LC480 system (Roche). For each experiment, two batches of NSCs were infected separately. For each, RT-qPCR was duplicated. Culture passage was between 10 and 12.

Western blotting

NSCs were infected at an MOI of 10, or left uninfected, and harvested 72 h pi. Cell extract preparations and western blotting analyses were performed as detailed elsewhere [11]. Detection was carried out using a chemiluminescence kit (Sigma). Analyses were performed with a Chemidoc system (Bio-Rad, Hercules, CA, USA). Densitometry analyses were performed using ImageJ software [17].

Immunofluorescence

Cells were cultured on coverslips, fixed in 4% formaldehyde for 20 min at 4 °C, and permeabilised in 0.3% Triton X-100 for 15 min at room temperature. Blocking buffer was PBS containing 5% FCS. Primary antibodies diluted in blocking buffer were applied overnight at 4 °C. Antibodies to IE, LIS1, DCX, Ki-67, and alphatubulin were diluted 500-, 250-, 250-, 100-, and 50-fold, respectively. Secondary antibodies diluted in blocking buffer were applied for 1 h at room temperature. After three washes with blocking buffer and three washes with PBS, cells were counterstained with 1 µg/ml DAPI (Sigma) and washed again three times with PBS before mounting the coverslips onto glass slides. Examination was performed using an LSM 710 confocal microscope (Zeiss, Oberkochen, Germany). Image processing was performed using either ImageJ (maximal-intensity projections, measurements of length) or Imaris (Oxford Instruments, Abingdon, UK) (3D reconstructions). The relative number of Ki-67-positive cells was assessed by manual counting from captures of five visual fields, each containing 100-200 cells.

Cell migration assays

Cell migration assays were performed using the Oris Cell Migration Assay (Platypus Technologies, Madison, WI, USA) according to the supplier's recommendations. NSCs were plated in dedicated 96-well plates at a density of 50 000 cells per well, in the presence of silicone stoppers at the centre of each well, to generate a cell-free exclusion zone. The next day, NSCs were infected by HCMV; then the culture medium was replaced with fresh medium containing laminin $(1 \,\mu g/cm^2)$ and the stoppers were removed, allowing for NSCs to colonise the exclusion zone. Brightfield pictures of each well were taken each day thereafter over 4 days, using an Apotome Axio-observer microscope (Zeiss). The area of the remaining cell-free zone was measured using ImageJ software. The growth rate of control or HCMVinfected NSC cultures was also assessed in parallel experiments through DAPI staining and counting of the nuclei over time, by using an automated ArrayScan microscopy device (Cellomics, Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA).

PAFAH1B1 silencing

NSCs were seeded at a density of 60 000 per cm² in 24-well plates. HIPEC cells were seeded at a density of 25 000 per cm² in 24-well plates. The day after, fresh medium containing 100 pmol of non-targeting- or LIS1-siRNAs was added to each well according to the supplier's recommendations (Horizon Discovery, Cambridge, UK) and 24 h later, cells were infected at an MOI of 10 or left uninfected. Immunofluorescence analysis was next performed at 4, 24, and 72 h pi. To assess cell death, cells were incubated for 30 min at 37 °C in growth medium supplemented with the Image-iTTM

DEAD reagent (Life Technologies) at a final concentration of 100 nm, before carrying out immunofluorescence assays as detailed above.

Immunohistochemical analyses

Brain tissue biopsies were collected from four human fetuses electively aborted because of HCMV infection and from two controls aborted for Di George syndrome with associated cardiopathy (control case 1200496) or for premature rupture of membranes, anamnios, and chorioamnionitis (control case 1200094). Immunohistochemical brain analysis of controls and HCMV cases was performed on sections cut at 8 µm from paraffin blocks, using standard methods. Antigen was retrieved through two consecutive incubations (11 and 10 min) in a microwave oven for DCX or one 40-min incubation at 95 °C in a heating bath for LIS1. Endogenous peroxidase activity and biotin were blocked by using the avidin-biotin and peroxidase blocking reagents (Vector Labs, Burlingame, CA, USA) for 10 min at room temperature. Primary antibodies were diluted 800-fold (DCX) or 250-fold (LIS1) in blocking buffer (3% BSA in PBS). Antibody specificity was ascertained by parallel staining experiments using either no primary antibody or a non-specific isotype control.

Staining for LIS1, DCX, and Mayer's haematoxylin counterstain was performed using an Autostainer device (Dako, Glostrup, Denmark), and resulting slides were scanned using a Panoramic 250 system (3D Histech, Budapest, Hungary) and analysed with the dedicated software (3D Histech).

Statistical analysis

Statistical analyses were performed using the StatEL plugin (Adscience SARL, Paris, France) for Excel (Microsoft, Redmond, WA, USA), using the Kruskal–Wallis test. Unless otherwise specified, error bars show 5% confidence intervals (CIs).

Results

In the search for genes with altered expression in HCMV-infected NSCs, we performed mRNA analysis using a dedicated array allowing us to analyse a set of 84 genes related to neurogenesis. We used an MOI of 10 with respect to titration in MRC-5 cells, a condition that led to approximately 30-40% of NSCs displaying positive IE immunostaining 72 h post-infection. We reported previously that infection at this MOI does not result in any increased apoptosis [11]. Most of the genes of this array showed only minor changes in transcript levels upon HCMV infection (supplementary material, Table S1). Yet we found that the steady-state levels of mRNA of the genes ACHE, APOE, S100A6, and PAFAH1B1 were increased by 3.68-, 4.65-, 5.73-, and 56.67-fold, respectively, in infected NSCs compared with uninfected control cells (Figure 1A). We focused

Increased PAFAH1B1-LIS1 in congenital cytomegalovirus infection

on *PAFAH1B1* because this gene is the principal causative gene of lissencephalies (as reviewed in refs 7 and 18) and because lissencephalic brain is frequently reported in severe congenital HCMV infection. Therefore, we next carried out RT-qPCR to validate the result of the first screen, using mRNA extracted from NSCs infected by two different HCMV strains, AD169 and VHL/E. Consistent with the array results, we found that the steady-state levels of *PAFAH1B1* mRNA were increased 37.67- and 41.32-fold in NSCs infected by AD169 or VHL/E, respectively, compared with the uninfected controls (Figure 1A). Notably, no significant change in the *PAFAH1B1* mRNA levels was detected in NSCs treated by UV-irradiated viral particles of the two strains.

This prompted us to investigate the levels of the protein encoded by PAFAH1B1, namely LIS1, in NSCs. In uninfected NSCs, western blotting revealed the expression of only minute amounts of LIS1 (45 kDa) (Figure 1B) and no detectable LIS1 was observed by immunofluorescence analysis (Figure 1C, top row). In contrast, both western blotting and immunofluorescence revealed a dramatic increase of LIS1 protein levels in HCMV-infected NSCs, compared with uninfected control cells or with NSCs exposed to a UV-irradiated viral inoculum (Figure 1B,C). Interestingly, immunostaining for HCMV immediate-early antigen (IE) revealed that increased staining for LIS1 was only observed in infected NSCs and not in their neighbouring uninfected counterparts (Figure 1C,D). Further examination of infected cells at higher magnification or with 3D reconstructions revealed dot-like cytoplasmic LIS1 immunostaining, distributed as linearly arranged foci, indicative of cytoskeletal association (Figure 1D and supplementary material, Movies S1-S4). In most infected cells, a greater density of fluorescence spots was observed in the perinuclear zone.

LIS1 is an atypical microtubule-associated protein [19,20]. To gain insight into the impact of HCMV infection on the microtubule network of NSCs, we carried out immunofluorescence analysis of tubulin in infected NSCs. We detected no difference in the shape of the microtubule network in infected NSCs compared with the controls (supplementary material, Figure S1). This suggested that microtubules were not impacted by infection at a detectable level in cultured NSCs and that the pattern of LIS1 staining in infected NSCs is not the consequence of a disrupted microtubule network.

We next investigated the consequence of infection by HCMV on *PAFAH1B1* expression in human fetal lung MRC-5 fibroblasts. mRNA RT² profiling (supplementary material, Table S2) and immunofluorescence analysis (supplementary material, Figure S2) showed that *PAFAH1B1* mRNA levels and LIS1 immunostaining were increased 8.5-fold in infected MRC-5 cells compared with uninfected MRC-5. Hence, increased LIS1 expression upon HCMV infection did not seem to be specific to NSCs.

Because poly(micro)gyria and lissencephaly are considered as neural cell migration disorders [5,6,21], we we used the Oris cell migration assay, allowing reliable assessment of the ability of infected or control NSCs to fill an exclusion zone created by a silicone stopper present in the centre of the well during seeding and removed after infection. We observed that infected NSC cultures were unable to efficiently colonise the exclusion zone after 4 days, a stage when their uninfected counterparts had almost filled the whole area (Figure 2A,B). This migration deficit of infected cells was not due to cell lysis, since 4 days is an insufficient timescale for the completion of a full HCMV lytic cycle in NSCs, as shown previously [11]. To ensure that this effect was not the consequence of defective cell proliferation upon infection, we assessed the growth rates of infected and control NSCs over time and found no significant differences (Figure 2C). It has been shown that HCMV infection can have variable outcomes on the cell cycle, by either blocking or supporting proliferation [15,22,23]. Therefore, we carried out immunofluorescence analysis of the Ki-67 proliferation marker using HCMV-infected NSCs. We found no significant difference in the abundancy of Ki-67⁺ cells between uninfected cultures, cultures infected by the strain AD169 or by the strain VHL/E, or cultures treated with irradiated VHL/E viral particles (supplementary material, Figure S3). Importantly, we detected many double-positive IE+, Ki-67+ cells among NSCs infected by the VHL/E or the AD169 strain, indicating that infected NSCs were still able to undergo the cell cycle. Therefore, the results of the migration assays most likely revealed impaired mobility of HCMV-infected NSCs. NSCs treated with a UV-irradiated viral inoculum showed no differences with the controls, indicating that only replicationcompetent HCMV was able to disrupt NSC mobility. Taken together, these findings show that HCMV infection impairs the migration of NSCs in vitro. Next, we investigated whether counteracting LIS1 overexpression would restore the migratory capacity of HCMV-infected NSCs. To this aim, we treated NSC cultures with either siRNAs specific to LIS1 or non-targeting control siR-NAs. The two siRNAs shared identical chemistry and formulation. According to the supplier, a 72-h delay is required to achieve a good efficacy of silencing; therefore we started with siRNA treatment and then inoculated the cultures with HCMV. We observed a drastically different outcome for the survival of infected NSCs upon treatment with either LIS1- or control siR-NAs. Indeed, we observed dramatic levels of cell death in HCMV-infected NSCs when they were exposed to the LIS1 siRNA, as evidenced by the positive staining with the Image-iTTM DEAD reagent, which only enters into dying cells (supplementary material, Figure S5). Cell death was so massive that it could be only evidenced at 4 h pi and cells were completely lost thereafter. In contrast, treatment with the non-targeting siRNA did not result in a detectable effect on cell survival. Interestingly, there was no impact on the survival of

investigated possible changes in the migratory capacities of NSCs upon infection by HCMV. Towards this aim,

uninfected NSCs upon exposure to either LIS1- or



Figure 1 Legend on next page.



Figure 2. Defective migration ability of HCMV-infected NSCs. (A) Representative cell migration assay (Oris) showing defective migration on a laminin substrate of NSCs infected at effective MOI (1, 3, 10) compared with uninfected NSCs (NI) or NSCs exposed to UV-irradiated HCMV (HCMV-UV), or infected with ineffective MOI (0.1). The remaining cell-free area, which is expressed as a percentage of that before infection (day 0), is shown. At least six identical replicate wells were seeded for each experimental condition and three separate experiments were performed with similar results. (B) Representative views of the exclusion zone in the presence of NSCs labelled by calcein (1 h at 37 °C), uninfected (NI) or infected (HCMV), at an MOI of 10, at days 0 and 4 pi. (C) Analysis of the growth rates of HCMV-infected or uninfected control NSC cultures. The number of cells per cm², as assessed by counting of nuclei after DAPI staining, is shown. NSCs were cultured in triplicate 0.35 cm² wells and the experiment twice.

non-targeting siRNAs. To follow up this observation and assess its specificity, we investigated the outcomes of LIS1 siRNA treatment using another HCMVpermissive cell line of non-neuronal origin, namely the cytotrophoblast cell line HIPEC. Interestingly, HIPEC cells do not show detectable expression of LIS1, should they be infected or not. In this case, we did not observe any effect of LIS1 siRNA on the survival of HCMVinfected HIPEC cells (supplementary material, Figure S5). This result ruled out the possibility of a direct cytotoxic effect of the LIS1 siRNA solution. Taken together, our results suggest that LIS1 overexpression is critical for the survival of HCMV-infected NSCs.

To assess the clinical relevance of our findings concerning LIS1 upregulation upon infection, we next explored LIS1 levels in histological sections of brain from congenitally HCMV-infected fetuses (n = 4) compared with control samples (n = 2) with a matching

Figure 1. Enhanced PAFAH1B1/LIS1 expression in HCMV-infected human neural stem cells. (A) RT-qPCR analysis showing dramatically increased levels of PAFAH1B1 transcripts in HCMV-infected NSCs (MOI 10) at 72 h post-infection (pi). Left: RT² profiler analysis. The foldchange values of relative mRNA levels for each gene, compared with that from uninfected NSCs, are shown. Means \pm Cl of three independent experiments, two replicates per condition. Right: RT-qPCR analysis of PAFAH1B1 mRNA levels in NSCs infected by HCMV strains AD169 (AD169) or VHL/E (VHL/E) (live, black boxes), or with UV-irradiated AD169 or VHL/E (UV, white boxes). Fold-change values of PAFAH1B1 mRNA levels, compared with that from uninfected NSCs. Means \pm Cl of two independent experiments, two replicates per condition. (B) Representative western blot (top) and densitometry analysis (bottom) of three independent western blotting analyses of LIS1 levels in HCMV-infected (AD169 strain, MOI 10) NSCs (HCMV) compared with uninfected controls (NI) or with NSCs exposed to UV-irradiated HCMV (HCMV-UV) at 72 h pi. Error bars show SD. For densitometry analysis, data were normalised to actin levels and are expressed as relative densitometry units (DU), compared with uninfected cells arbitrarily set to 1. (C) Immunofluorescence analysis using antibodies specific to LIS1 (red) or IE (green) showing strong LIS1 immunostaining in NSCs infected by HCMV strain AD169 (AD169) or VHL/E (VHL/E) at an MOI of 10 (HCMV) compared with uninfected NSC cultures (NI) or with NSCs exposed to UV-irradiated VHL/E HCMV (HCMV-UV) at 72 h pi. This immunofluorescence analysis is representative of at least ten independent experiments, which gave identical results. Scale bar = 20 µm. Cyan = DAPI counterstain. (D) Representative enlarged images of immunofluorescence analysis using antibodies specific to LIS1 (red) or IE (green). Images are maximal-intensity projections of x/y optical section stacks acquired by confocal microscopy, for four different infected cells. Note the cytoplasmic dot-like pattern of LIS1 immunostaining in HCMV-infected cells compared with non-infected cells (white arrowheads). The nucleus groove as seen in the second and fourth cells shown (black arrowheads) is typical of a productively infected cell. Scale bar = 10 µm. Cyan = DAPI counterstain.



Figure 3. Increased levels of LIS1 in histological sections from HCMV-infected fetal brains. Representative results of immunohistochemical staining of brain sections from HCMV-infected fetuses (HCMV) or from controls (NI) using anti-LIS1 or no primary antibody or an isotype control. The reference number of each sample is indicated on the left of each row. The subventricular zone (SVZ) and the ependyma monolayer which segregates the SVZ from the ventricular space are shown. Note that cells strongly immunoreactive to anti-LIS1 antibody are detected in the periventricular areas and in ependyma in infected cases but not in controls. Scale bar = $50 \mu m$.

gestational age (23 weeks). All four infected cases presented (poly)microgyria, which was associated in three cases with lissencephaly (cases 4752, 4261, 4099), hallmarks of migration abnormalities [5]. They were associated with microcephaly (cases 4752, 3955), ventriculomegaly (cases 4752, 4261, 3955), vascular lesions (cases 4752, 4099, 3955), and/or intraventricular (case 4261) or subventricular (case 4099) haemorrhage. Detailed clinical features of these cases have been reported elsewhere [11]. There was no familial history of neurological abnormalities in any of the cases. Fetal infection by HCMV was evidenced by immunohistopathological analyses of the presence of IE⁺ cells, as shown previously [11]. No genetic screen was performed, the aetiology of the disease being infection by HCMV.

LIS1 was barely detectable in controls, whereas sections from infected cases showed strongly increased

© 2021 The Pathological Society of Great Britain and Ireland. Published by John Wiley & Sons, Ltd. www.pathsoc.org



Figure 4. Increased levels of DCX in histological sections from HCMV-infected fetal brains. Representative results of immunohistochemical staining of brain sections from HCMV-infected fetuses (HCMV) or from controls (NI) using anti-DCX or no primary antibody or an isotype control. The reference number of each sample is indicated on the left of each row. Note that cells strongly immunoreactive to anti-DCX anti-body are detected in the periventricular areas and in ependyma in infected cases but not in controls. Scale bar = $50 \mu m$.

LIS1 levels throughout the parenchyma, particularly in the subventricular zone (SVZ) and the ependyma monolayer, which segregates the SVZ from the ventricular space (Figure 3). Notably, the SVZ is known to host the neural progenitors/stem cells [24].The validity of our histological staining was further ensured by staining of adjacent sections with an isotype control or by omission of the primary antibody, which were all, as expected, negative. These findings suggested that LIS1 was upregulated in all cells, infected or not, *in utero*. Our observation indicates that *PAFAH1B1* expression is abnormally increased in the brains of congenitally infected fetuses, thereby strongly supporting its association with the pathogenesis of the sequelae of the infection.

LIS1 is co-expressed and interacts physically with doublecortin (DCX), another microtubule-associated protein [25]. Similarly to PAFAH1B1, the gene DCX has been described as a causative gene for certain forms of lissencephalies (23%) [26]. In our initial screening, DCX mRNA levels tended to be increased in HCMVinfected versus uninfected NSCs (supplementary material, Table S1). Therefore, we investigated DCX levels, both in HCMV-infected NSCs and in the histological sections from infected cases or controls. We observed increased levels of DCX in HCMV-infected NSCs compared with the uninfected controls (supplementary material, Figure S4). It is noteworthy that DCX staining was punctate and mostly perinuclear, recalling that of LIS1. Not all infected NSCs, however, were positive for DCX. Immunohistochemical analysis was only possible for cases 3955 and 4752 because of the lack of available

© 2021 The Pathological Society of Great Britain and Ireland. Published by John Wiley & Sons, Ltd. www.pathsoc.org histological material for the other samples. We found strongly increased immunostaining for DCX throughout the brains of congenitally infected cases, whereas DCX expression was hardly detectable in control sections at this gestational age (Figure 4). These results suggest widespread overexpression of LIS1 and DCX in the parenchyma. It is noteworthy that no DCX expression was detectable for MRC-5 cells, whether infected or not, by mRNA (supplementary material, Table S2) or immunofluorescence analyses (not shown).

Discussion

In this study, we report that congenital HCMV infection is associated with strongly increased expression of *PAFAH1B1*/LIS1, both in human NSCs (Figure 1) and in congenitally infected fetal brains, as early as the 23rd week of gestation (Figure 3) [27].

We observed dramatically increased LIS1 levels in HCMV-infected NSCs. We previously reported that infection by HCMV triggered the activity of the nuclear receptor PPAR γ in NSCs [11]. In contrast to that study, we did not detect any paracrine effect leading to increased LIS1 levels in the neighbouring uninfected NSCs. The pattern of LIS1 immunostaining in HCMV-infected NSCs is suggestive of an association with the cytoskeleton (Figure 1C,D). This finding is in agreement with previous studies showing a physical association of LIS1 with microtubules [28,29]. Moreover, we found that LIS1 concentrated as puncta, with a size reaching

up to 1.5 μ m in diameter (Figure 1C), consistent with previous observations in COS-7 cells overexpressing LIS1 [28]. Perinuclear LIS1 immunolabelling observed in infected NSCs also agrees with previous work showing an association of LIS1 with the Golgi complex [30].

The molecular role of LIS1 has been extensively studied [19,20]. LIS1 is an adaptor for the microtubule motor dynein, which it maintains connected to microtubules, presumably acting as a 'propeller wheel' [27]. LIS1 is critical for cytoskeleton dynamics, nucleokinesis, and neural cell mobility [21]. Moreover, LIS1 is a downstream effector of reelin, a pivotal regulator of neuronal migration [31], and of platelet-activating factor (PAF), a lipid mediator regulating neuronal migration and neurite outgrowth [32,33]. LIS1 has been shown to reduce the rate of transition from growth to shortening of microtubules [29], a dynamic process that could not be detected in our immunofluorescence assay. Together, these studies point to LIS1 as a key effector of neural cell motility. We observed defective migration of HCMVinfected NSCs in a two-dimension assay, a model that does not take into account the possible contribution of glial cells in neural progenitor migration during neurodevelopment [34,35]. With our study, it is important to stress that current evidence does not allow us to establish any formal link between overexpressed LIS1 and altered migration of HCMV-infected NSCs. Using a lentiviral transduction strategy, we failed to generate viable NSCs ectopically expressing LIS1 at a level sufficient to cause a change in migration abilities. On the other hand, treatment with siRNA targeting LIS1 led to the specific death of infected NSCs. Therefore, it is not possible to formally conclude that LIS1 plays a role per se in defective migration of infected NSCs. Depending on the cell context, HCMV infection has been shown to exert opposite outcomes on cell migration. For instance, HCMV promotes the motility of monocytes through STAT1 activation [36] and also enhances the migration of arterial smooth muscle cells through expression of the viral chemokine receptor US28 [37]. Conversely, HCMV impairs the migration of epithelial (cytotrophoblasts) [16] or endothelial [38] placenta cells through PPARy activation or downregulation of angiogenesis genes, respectively.

We also observed strong immunostaining for LIS1 and DCX in histological sections of cases infected by HCMV compared with sections from control cases, which showed no or weak immunostaining (Figures 3 and 4). Key events in neuronal migration occur between the fifth and 22nd gestational weeks of human development [27]. The gestational age (23 weeks) of the four cases reported herein is consistent with the occurrence of pathogenic events occurring within this period of development. To our knowledge, histological analysis of LIS1 expression during development is not documented. In contrast, it has been shown that DCX expression is detectable only within the first 20 gestational weeks in the human fetal cerebrum [39]. This finding is consistent with our results, with the absence of DCX immunostaining in the brains of the control cases, also aged

23 gestational weeks. We have previously shown the immunohistochemical presence of the HCMV antigen IE in the same cases as the present study [11]. IE^+ cells are localised in a few discrete foci scattered throughout the brain parenchyma or in vessels. This pattern clearly does not overlap with that of LIS1 or DCX in the infected samples. It is, however, still possible that a non-cell autonomous effect, not detected in cultured NSCs, underlies increased LIS1 levels in the infected fetal brain. We had reported PPARy activation in HCMV-infected fetal brains [11]. In that study, PPARy and IE immunostainings did not overlap in histological samples. Yet we showed that infected NSCs were able to trigger PPARy overexpression in uninfected neighbouring cells by releasing specific activating lipids. It is therefore likely that LIS1 overexpression might also be triggered by soluble mediators of unknown origin in the infected fetal brain. Such a bystander effect could possibly be of glial origin since it was not detected in NSC cultures. Because PAFAH1B1 and DCX mutations are both causative in hereditary disorders of gyration including lissencephaly, we propose herein that their dysregulated expression at least contributes to gyration abnormalities in severe congenital HCMV infection. Mutational events leading to either haploinsufficiency or overexpression of PAFAH1B1 are primary causes in a spectrum of neurodevelopmental disorders. Most documented are the cases when haploinsufficiency of PAFAH1B1 causes classic lissencephaly (OMIM #607432) [40]. However, classic lissencephaly includes subcortical band heterotopia, which consists of circumferential bands of heterotopic neurons underneath the cortex. To our knowledge, this feature has never been reported upon HCMV congenital infection. Conversely, PAFAH1B1 microduplications are associated with brain malformations, such as microcephaly or ventriculomegaly, and cognitive impairment [40,41]. PAFAH1B1 duplications likely result in increased expression because gene dosage is consistent with copy number in autosomes [42,43]. Accordingly, increased expression of PAFAH1B1 mRNA in lymphocytes from a patient with duplicated PAFAH1B1 has been reported [41]. A transgenic mouse conditionally overexpressing LIS1 in the developing brain showed a decrease in brain size and a distorted cellular organisation in the ventricular zone [41]. Altogether, these findings underscore that LIS1 dosage must be finely tuned for proper brain development. A recent study revealed that mutations within PAFAH1B1 or DCX accounted for the majority of lissencephaly cases [26]. Therefore, it is very likely that the unbalanced expression of PAFAH1B1 and DCX in the HCMV-infected developing brain underlies brain dysgenesis. Abnormal neural cell migration was reported to be associated with cognitive impairment independently of the infectious context [6]. Thus, similar pathogenic events could possibly underlie mental retardation in mild cases of congenital HCMV infection.

It is likely that the timing and extent of infection, the nature of its molecular targets other than *PAFAH1B1*,

Increased PAFAH1B1-LIS1 in congenital cytomegalovirus infection

and the host immune response also modulate the nature and severity of sequelae.

References

Given the heterogeneity of the phenotypes due to duplications of PAFAH1B1, more work is needed to formally correlate LIS1 levels in the developing brain with the severity of the outcomes of HCMV infection. Indeed, LIS1 expression levels in the four cases presented here were not increased to the same extent, with no apparent relation with the severity of sequelae. An association study between PAFAH1B1 variants and the severity of the outcomes of the infection in mildly or severely affected cases could allow the identification of possible severity markers. Indeed, HCMV alters gene expression by subverting the activity of a variety of host transcription factors [15,44]. We have carried out in silico analysis of conserved transcription factor binding sites (TFBSs) within PAFAH1B1. We identified that conserved putative responsive elements to PPARy, AP1, and CREB were located within the 5' proximal promoter region of PAFAH1B1, or in its first intron (sequence details available upon request). Also, a frequent polymorphism within the 3' untranslated region of PAFAH1B1 has been identified [45]. Since PPARy, AP1, and CREB are triggered by HCMV infection [11,15,44], any hypothetical variation within these segments could possibly modify the response of PAFAH1B1 to HCMV infection.

In conclusion, our findings reveal that *PAFAH1B1* is a critical target of congenital HCMV infection and a plausible contributor to the pathogenesis of brain sequelae. They also shine a new light on the pathophysiological bases of congenital HCMV infection by suggesting as well that defective neural cell migration may contribute to the neurodevelopmental sequelae of infection.

Acknowledgements

The present study was founded by institutional grants from INSERM, the CNRS and University of Toulouse. We wish to thank the AP-HP staff for collection of samples and F Capilla and C Salon from the US006 INSERM histology facility. We thank S Allart, A Canivet-Laffitte and D Daviaud for technical assistance at the cellular imaging facility TRI-CPTP, Toulouse. We also thank A Thouard for technical help and R Liblau, C Malnou, A Saoudi and E Suberbielle for their critical reading of the manuscript and useful comments. I-Stem is part of the Biotherapies Institute for Rare Diseases (BIRD).

Author contributions statement

MR carried out experiments and analysed data. MB, HM and YS carried out experiments. AB, BB, JA and ML-V provided samples or cells. DGD analysed data and wrote the manuscript. SC performed study design, carried out experiments, analysed data and wrote the manuscript. All the authors had final approval of the submitted and published versions.

- Zuhair M, Smit GSA, Wallis G, et al. Estimation of the worldwide seroprevalence of cytomegalovirus: a systematic review and metaanalysis. *Rev Med Virol* 2019; 29: e2034.
- Cannon MJ. Congenital cytomegalovirus (CMV) epidemiology and awareness. J Clin Virol 2009; 46(suppl 4): S6–S10.
- Cheeran MC, Lokensgard JR, Schleiss MR. Neuropathogenesis of congenital cytomegalovirus infection: disease mechanisms and prospects for intervention. *Clin Microbiol Rev* 2009; 22: 99–126.
- White AL, Hedlund GL, Bale JF Jr. Congenital cytomegalovirus infection and brain clefting. *Pediatr Neurol* 2014; 50: 218–223.
- Stouffer MA, Golden JA, Francis F. Neuronal migration disorders: focus on the cytoskeleton and epilepsy. *Neurobiol Dis* 2016; 92: 18–45.
- Guerrini R, Parrini E. Neuronal migration disorders. *Neurobiol Dis* 2010; 38: 154–166.
- Fry AE, Cushion TD, Pilz DT. The genetics of lissencephaly. *Am J Med Genet C Semin Med Genet* 2014; 166: 198–210.
- Tsutsui Y, Kosugi I, Kawasaki H, *et al.* Roles of neural stem progenitor cells in cytomegalovirus infection of the brain in mouse models. *Pathol Int* 2008; 58: 257–267.
- Luo MH, Hannemann H, Kulkarni AS, et al. Human cytomegalovirus infection causes premature and abnormal differentiation of human neural progenitor cells. J Virol 2010; 84: 3528–3541.
- Belzile JP, Stark TJ, Yeo GW, *et al.* Human cytomegalovirus infection of human embryonic stem cell-derived primitive neural stem cells is restricted at several steps but leads to the persistence of viral DNA. *J Virol* 2014; 88: 4021–4039.
- Rolland M, Li X, Sellier Y, *et al.* PPARγ is activated during congenital cytomegalovirus infection and inhibits neuronogenesis from human neural stem cells. *PLoS Pathog* 2016; **12:** e1005547.
- Han D, Byun SH, Kim J, et al. Human cytomegalovirus IE2 protein disturbs brain development by the dysregulation of neural stem cell maintenance and the polarization of migrating neurons. J Virol 2017; 91: e00799-17.
- Odeberg J, Wolmer N, Falci S, et al. Human cytomegalovirus inhibits neuronal differentiation and induces apoptosis in human neural precursor cells. J Virol 2006; 80: 8929–8939.
- Odeberg J, Wolmer N, Falci S, et al. Late human cytomegalovirus (HCMV) proteins inhibit differentiation of human neural precursor cells into astrocytes. J Neurosci Res 2007; 85: 583–593.
- Fortunato EA, McElroy AK, Sanchez I, et al. Exploitation of cellular signaling and regulatory pathways by human cytomegalovirus. *Trends Microbiol* 2000; 8: 111–119.
- Leghmar K, Cenac N, Rolland M, et al. Cytomegalovirus infection triggers the secretion of the PPAR gamma agonists 15-hydroxyeicosatetraenoic acid (15-HETE) and 13-hydroxyoctadecadienoic acid (13-HODE) in human cytotrophoblasts and placental cultures. PLoS One 2015; 10: e0132627.
- Schneider CA, Rasband WS, Eliceiri KW. NIH Image to ImageJ: 25 years of image analysis. *Nat Methods* 2012; 9: 671–675.
- Saillour Y, Carion N, Quelin C, et al. Lis1-related isolated lissencephaly: spectrum of mutations and relationships with malformation severity. Arch Neurol 2009; 66: 1007–1015.
- Vallee RB, Tsai J-W. The cellular roles of the lissencephaly gene LIS1, and what they tell us about brain development. *Genes Dev* 2006; 20: 1384–1393.
- Wynshaw-Boris A, Gambello MJ. LIS1 and dynein motor function in neuronal migration and development. *Genes Dev* 2001; 15: 639–651.
- Kato M, Dobyns WB. Lissencephaly and the molecular basis of neuronal migration. *Hum Mol Genet* 2003; 12: R89–R96.
- Spector DH. Human cytomegalovirus riding the cell cycle. Med Microbiol Immunol 2015; 204: 409–419.
- Castillo JP, Kowalik TF. Human cytomegalovirus immediate early proteins and cell growth control. *Gene* 2002; 290: 19–34.

© 2021 The Pathological Society of Great Britain and Ireland. Published by John Wiley & Sons, Ltd. www.pathsoc.org

M Rolland et al

- Landgren H, Curtis MA. Locating and labeling neural stem cells in the brain. J Cell Physiol 2011; 226: 1–7.
- Caspi M, Atlas R, Kantor A, *et al.* Interaction between LIS1 and doublecortin, two lissencephaly gene products. *Hum Mol Genet* 2000; 9: 2205–2213.
- Di Donato N, Timms AE, Aldinger KA, et al. Analysis of 17 genes detects mutations in 81% of 811 patients with lissencephaly. Genet Med 2018; 20: 1354.
- Wynshaw-Boris A. Lissencephaly and LIS1: insights into the molecular mechanisms of neuronal migration and development. *Clin Genet* 2007; 72: 296–304.
- Smith DS, Niethammer M, Ayala R, et al. Regulation of cytoplasmic dynein behaviour and microtubule organization by mammalian Lis1. Nat Cell Biol 2000; 2: 767–775.
- Sapir T, Elbaum M, Reiner O. Reduction of microtubule catastrophe events by LIS1, platelet-activating factor acetylhydrolase subunit. *EMBO J* 1997; 16: 6977–6984.
- Bechler ME, Doody AM, Racoosin E, et al. The phospholipase complex PAFAH Ib regulates the functional organization of the Golgi complex. J Cell Biol 2010; 190: 45–53.
- Bock HH, May P. Canonical and non-canonical reelin signaling. Front Cell Neurosci 2016; 10: 166.
- Tokuoka SM, Ishii S, Kawamura N, et al. Involvement of plateletactivating factor and LIS1 in neuronal migration. Eur J Neurosci 2003; 18: 563–570.
- Vallee RB, Faulkner NE, Tai CY. The role of cytoplasmic dynein in the human brain developmental disease lissencephaly. *Biochim Biophys Acta* 2000; 1496: 89–98.
- Buchsbaum IY, Cappello S. Neuronal migration in the CNS during development and disease: insights from *in vivo* and *in vitro* models. *Development* 2019; 146: dev163766.
- Reiner O. LIS1 and DCX: implications for brain development and human disease in relation to microtubules. *Scientifica (Cairo)* 2013; 2013: 393975.

- 36. Collins-McMillen D, Stevenson EV, Kim JH, et al. Human cytomegalovirus utilizes a nontraditional signal transducer and activator of transcription 1 activation cascade via signaling through epidermal growth factor receptor and integrins to efficiently promote the motility, differentiation, and polarization of infected monocytes. J Virol 2017; 91: e00622–e00617.
- Streblow DN, Soderberg-Naucler C, Vieira J, et al. The human cytomegalovirus chemokine receptor US28 mediates vascular smooth muscle cell migration. Cell 1999; 99: 511–520.
- Gustafsson RKL, Jeffery HC, Yaiw K-C, et al. Direct infection of primary endothelial cells with human cytomegalovirus prevents angiogenesis and migration. J Gen Virol 2015; 96: 3598–3612.
- Mizuguchi M, Qin J, Yamada M, et al. High expression of doublecortin and KIAA0369 protein in fetal brain suggests their specific role in neuronal migration. Am J Pathol 1999; 155: 1713–1721.
- Blazejewski SM, Bennison SA, Smith TH, et al. Neurodevelopmental genetic diseases associated with microdeletions and microduplications of chromosome 17p13.3. Front Genet 2018; 9: 80.
- Bi W, Sapir T, Shchelochkov OA, et al. Increased LIS1 expression affects human and mouse brain development. Nat Genet 2009; 41: 168–177.
- Tang YC, Amon A. Gene copy-number alterations: a cost-benefit analysis. *Cell* 2013; 152: 394–405.
- Pires JC, Conant GC. Robust yet fragile: expression noise, protein misfolding, and gene dosage in the evolution of genomes. *Annu Rev Genet* 2016; 50: 113–131.
- Paulus C, Nevels M. The human cytomegalovirus major immediateearly proteins as antagonists of intrinsic and innate antiviral host responses. *Viruses* 2009; 1: 760–779.
- Koch A, Tonn J, Albrecht S, et al. Frequent intragenic polymorphism in the 3' untranslated region of the lissencephaly gene 1 (LIS-1). *Clin Genet* 2008; 50: 527–528.

SUPPLEMENTARY MATERIAL ONLINE

Supplementary figure legends

Figure S1. Immunofluorescence analysis of HCMV-infected (HCMV) or uninfected (NI) NSCs with antibodies to IE (green) or alpha-tubulin (red)

Figure S2. Immunofluorescence analysis of HCMV-infected (HCMV) or uninfected (NI) MRC-5 cells, using antibodies to IE (green) or LIS1 (red) Figure S3. Ki-67 analysis of NSCs

Figure S4. Immunofluorescence analyses of HCMV-infected (HCMV) or uninfected (NI) NSCs or HIPEC cells, treated with either LISI-siRNA (siLIS1) or non-targeting siRNA (siNT)

Figure S5. Immunofluorescence analysis of HCMV-infected (HCMV) or uninfected (NI) NSCs, using antibodies to IE (green) or DCX (red)

Table S1. RT² profiler analysis of neuronogenesis-related genes in HCMV-infected NSCs

Table S2. RT² profiler analysis of neuronogenesis-related genes in HCMV-infected MRC-5 cells

Movies S1-S4. 3D reconstructions of immunofluorescence analyses of HCMV-infected NSCs

102

6. Annexe 6 : Fresque / Ma thèse sur un mur

En 2019, j'ai participé au projet de communication scientifique et artistique « Ma thèse sur un mur » soutenu par Campus France. Au cours de ce travail, j'ai exposé ma thématique de recherche à mon binôme le street artiste brésilien Heitor Corrêa qui en a réalisé une illustration imagée. Nous avons reçu le premier prix, et Heitor a donc peint son œuvre sous forme de fresque de 10 mètres de haut sur un mur de l'Université Toulouse-II-Jean-Jaurès. Au-delà de la sensibilité artistique propre à chacun, c'est un bel exemple de coopération interdisciplinaire à visée de partager des thématiques scientifiques au plus près du grand public.



Photo ©Mathèsesurunmur