AIX-MARSEILLE UNIVERSITE
Faculté des Sciences de Luminy
Ecole Doctorale des Sciences de la Vie et de la Santé

THESE DE DOCTORAT

En vue de l'obtention du grade de
DOCTEUR DE L'UNIVERSITE D'AIX-MARSEILLE
Spécialité : Neurosciences

Présentée et soutenue publiquement par

Robin CLOAREC
le 17 décembre 2015

Titre :

Caractérisation d'un modèle d'infection cérébrale *in utero* par le cytomégalovirus chez le rat : Conséquences post-natales et rôle de l'activation microgliale

Jury :

Professeur Philippe NAQUET, Président

Docteur Sophie LAYE, Rapporteur

Professeur Sophie ALAIN, Rapporteur

Professeur Stéphane AUVIN, Examinateur

Professeur Fabrice BARTOLOMEI, Examinateur

Docteur Pierre SZEPETOWSKI, Directeur de thèse

REMERCIEMENTS

Je tiens à remercier en premier lieu tous les membres du jury : Le Dr Sophie Layé et le Pr Sophie Alain qui me font l'honneur d'être rapporteurs de ce travail, ainsi que le Pr Stéphane Auvin et le Pr Fabrice Bartolomei d'avoir accepté d'examiner et de juger ce travail. Merci au Pr Philippe Naquet d'avoir accepté de présider cette soutenance.

Je voudrais remercier plus particulièrement mon directeur de thèse, le Dr Pierre Szepetowski qui m'a donné l'opportunité de faire une thèse dans son équipe. Je te remercie très sincèrement de m'avoir supporté (dans les deux sens du terme) pendant toutes ces années. Merci pour cette confiance que tu m'as accordée dès le départ, pour la rigueur scientifique que tu m'as inculquée et pour ton ouverture d'esprit. Ces qualités ne sont pas données à tous les directeurs de thèse et m'ont permis de grandir scientifiquement. J'espère que nos chemins se recroiseront un jour, étant donné le projet professionnel que j'envisage, et que nous pourrons à nouveau collaborer ensemble.

Un grand merci à tous les membres de la Szep Team, je pense à Nadine qui m'a permis de devenir un bon expérimentateur en me donnant, dès mon master 2, les rudiments essentiels pour réaliser de bonnes manips. Merci à Sylvian, pour son aide précieuse durant les derniers mois de ma thèse, et pour toutes nos discussions scientifiques qui m'ont beaucoup apportées. Un énorme merci (et bisou) à Manalou pour tous ces bons moments partagés, je te souhaite plein de bonnes choses pour la suite de ta carrière. Tu vas beaucoup me manquer. J'ai également une pensée particulière pour Annick, qui m'a également beaucoup appris, et qui a toujours su prendre soin de moi. Nos parties de rigolade et ton humanité me manquent terriblement.

Merci également à tous les membres de l'INMED que j'ai eu le plaisir de côtoyer pendant ces années. Je pense en particulier au Dr Constance Hammond, qui m'a transmis son savoir d'électrophysiologiste durant mon master 2 et permis d'ajouter une nouvelle corder à mon arc. (Très utile pour un Robin). Merci aussi à Lauriane qui m'a dispensé de la table des abréviations! Un grand merci à Bahija pour son sourire permanent et son efficacité remarquable.

Je remercie spécialement Lamine, mon pote, mon frère, mon Sgibouloux, mon Sgiboulbak, mon Bilbo... Qu'aurais-je fait sans toi ? Je repense à tout ce que nous avons partagé et accompli ensemble, depuis notre rencontre. Dans quelques mois, tu vas partir très loin, mais sache que je serai toujours là pour toi. Tu vas énormément me manquer.

Je te souhaite beaucoup de réussite et je suis certain que tu vas devenir un chercheur très talentueux! Bon je sais qu'on va se revoir, mais bon…Je suis obligé de me préparer psychologiquement à ton grand départ. J'en profite pour remercier le groupe des Boulbouls (dont je fais partie) et en particulier, ma petite Fanny Cracra !

Je n'aurais pas pu accomplir cette dure tâche qu'est la thèse sans ma famille, qui a toujours été là pour m'encourager et me soutenir. Merci à mes parents qui ont toujours cru en moi. Si j'en suis là aujourd'hui, c'est grâce à votre amour et aux valeurs que vous m'avez transmises. Je vous aime. Un grand merci à Andrée, la super Nounette qui a toujours une belle pensée pour moi. Je suis tellement heureux de t'avoir dans ma vie.

Enfin, je tiens à remercier la personne qui a changé ma vie et la rend chaque jour plus merveilleuse. Emmanuelle, mon ange, mon amour, ma beauté, tu as toujours été là pour me soutenir, m'aider à garder la tête haute, même dans les moments les plus difficiles. Je n'ai jamais connu une femme comme toi, tu es l'incarnation même de la gentillesse, et j'ai tellement de chance de t'avoir à mes côtés. Je suis très fière de la personne que tu es et je te souhaite également toute la réussite que tu mérites, dans tous les projets que tu entreprends. Sache que je serai toujours là pour toi et que je t'aime.

RESUME 6
ABSTRACT 8
LISTE DES ABREVIATIONS 9
LISTE DES FIGURES 11
LISTE DES TABLEAUX 12
AVANT-PROPOS 13
INTRODUCTION 16
I) CONTRIBUTION DES INFECTIONS VIRALES DANS L'ETIOLOGIE DES MALADIES NEUROLOGIQUES. **17**
1. Infections virales et pathologies du SNC : Un lien de causalité complexe à établir 19
a. Accessibilité des virus au SNC 19
b. Les altérations au sein du SNC 22
c. Variabilité interindividuelle des infections virales cérébrales 27
d. Effets "à retardement" des infections virales (infections au cours de l'enfance ou de la vie intra-utérine) 30
2. Infections virales au cours du développement cérébral et pathologies neurologiques 32
a. Sensibilité du cerveau en développement pour les infections virales. 32
b. Troubles neurologiques associés à des infections virales au cours de l'enfance 34
c. Infections virales congénitales et pathologies neurodéveloppementales 35
II) LES INFECTIONS CONGENITALES A CYTOMEGALOVIRUS **41**
1. Aspects épidémiologiques et cliniques 41
a. Epidémiologie 41
b. Caractéristiques cliniques 42
c. Pathologies neurologiques et sensorielles liées aux infections congénitales à CMV 44
d. Transmission du virus 47
e. Diagnostic et prise en charge thérapeutique 48
2. Caractéristiques virologiques du CMV humain 53
a. Historique 53
b. Taxonomie 53
c. Structure des virions 53
d. Tropisme cellulaire au sein du SNC 54
e. Le cycle réplicatif du HCMV 58
f. Mécanismes de latence et de réactivation 60
3. Les modèles animaux d'infection congénitale à CMV et les mécanismes physiopathologiques suspectés 61

a. Le chimpanzé (CCMV) 62
b. Le macaque Rhésus (rhCMV) 63
c. Le cochon d'Inde (GPCMV) 63
d. Les modèles murins 63
e. Les modèles chez le rat 73
III) MECANISMES NEUROIMMUNOLOGIQUES MIS EN JEU AU COURS DES INFECTIONS A CMV DU CERVEAU EN DEVELOPPEMENT 76
1. Les cellules de l'immunité innée au sein du SNC 78
a. Les cellules microgliales 79
b. Les astrocytes et les oligodendrocytes. 85
c. Les macrophages périvasculaires, des méninges et des plexus choroïdes 85
2. Recrutement des cellules immunitaires périphériques dans le SNC. 86
a. Les voies d'entrées des leucocytes dans le cerveau 86
b. Interactions avec les lymphocytes T. 87
c. Les neutrophiles 88
d. Les mastocytes 88
e. Les cellules dendritiques 89
f. Les monocytes 89
3. Organisation de la réponse immunitaire à l'infection par le CMV dans le cerveau en développement. 92
a. Réponse précoce à l'infection cérébrale : rôle joué par l'immunité innée du SNC 92
b. Rôle de l'immunité adaptative 95
IV) OBJECTIFS DU TRAVAIL DE THESE. 102
RESULTATS 104
I) ARTICLE 1 105
1. Contexte et but de l'étude 105
2. Approches expérimentales 105
3. Principaux résultats 106
II) ARTICLE 2 108
1. Contexte et but de l'étude 108
2. Approche expérimentale 108
3. Principaux résultats 109
DISCUSSION 110
PERSPECTIVES 129
ANNEXES 134
REFERENCES 136

RESUME

L'infection par le cytomégalovirus (CMV) au cours de la grossesse est fréquente et représente la première cause de pathologie neurodéveloppementale. Elle peut avoir des conséquences développementales (polymicrogyrie, microcéphalie) et neurosensorielles (surdité, épilepsie, paralysie cérébrale) sévères. En dépit de cette importance médicale, il n'existe à ce jour aucun traitement préventif ou curatif satisfaisant, et les mécanismes physiopathologiques mis en jeu, en particulier au niveau du cerveau fœtal, restent mal connus. Des découvertes récentes sur les modèles murins d'infection cérébrale par le CMV, principalement réalisées pendant la période néonatale, ont apporté des données convergentes sur la physiopathologie de ces infections cérébrales ; notamment, le rôle joué par les cellules immunitaires périphériques dans la résolution de l'infection, et l'implication du système immunitaire cérébral (SIC) au cours du processus infectieux. Cependant, les fonctions précises du SIC, plus spécifiquement de la microglie et des macrophages au cours de l'infection par le CMV *in utero* ne sont pas clairement identifiées.

Afin de compléter et préciser les résultats précédemment obtenus dans différents modèles murins, et de comprendre le rôle joué par le SIC, le premier objectif de ma thèse a consisté à mettre au point et à caractériser un nouveau modèle d'infection cérébrale par le CMV au cours du développement *in utero* chez le rat. Dans ce modèle d'infection intracérébroventriculaire, j'ai pu tout d'abord mettre en évidence par immunohistochimie et cytométrie de flux une infection préférentielle des cellules des lignées myéloïde et lymphoïde. De surcroît, l'infection s'accompagne, en plus de la dysexpression de diverses chimiokines et de l'attraction de cellules immunitaires périphériques, d'une activation microgliale précoce, notamment localisée dans les régions infectées. Dans un deuxième temps, l'étude de ce modèle, notamment au cours des stades postnataux plus tardifs, a permis de mettre en exergue un certain nombre de similitudes avec la pathologie humaine : en particulier l'existence d'une surmortalité, de crises d'épilepsie généralisées tonico-cloniques, de troubles sensorimoteurs, et d'un déficit auditif. Dans une dernière étape, j'ai pu montrer dans ce modèle qu'en agissant spécifiquement sur la microglie et les macrophages, soit par déplétion, soit en inhibant l'état d'activation de ces cellules, il était possible de prévenir l'émergence du phénotype des animaux infectés, tant sur le plan de la dissémination virale que de certaines manifestations cliniques.

Dans l'ensemble, ces résultats confirment l'altération du SIC au cours de l'infection par le CMV du cerveau en développement, et suggèrent fortement, dans ce modèle, un rôle majeur joué par le système microglie/macrophage dans l'émergence de troubles neurologiques semblables à ceux observés dans la pathologie humaine correspondante.

ABSTRACT

Cytomegalovirus (CMV) infection during pregnancy is the leading cause of neurodevelopmental disorders (polymicrogyria, microcephaly) and may lead to severe sensorineural consequences (deafness, epilepsy, cerebral palsy and hearing loss). Despite this medical importance, no preventive or curative treatment is satisfactory to date, and the pathophysiological mechanisms, notably in the fetal brain, remain poorly understood. Recent findings in murine brain CMV infection, mostly in neonatal models, have brought converging insights into the pathogenesis of these infections; the possible role played by peripheral immune cells against infection and the involvement of the brain immune system (BIS) have been proposed.

The actual roles of BIS during *in utero* infection, and more specifically that of microglial cells and macrophages, remain unclear. In order to expand and precise the data previously obtained in the murine models, and to clarify the role of BIS, the first objective of my thesis was to design and to characterize a novel model of CMV infection during the fetal development of the rat brain. In this model where infection is being performed by intracerebroventricular injection of rat CMV, I have demonstrated by immunohistochemistry and flow cytometry, the prominent infection of cells of the myeloid and lymphoid lineages. Infection triggered dysexpression of various chemokines, attraction of peripheral immune cells, and early microglial activation, particularly in the areas of active infection. In a second part, further analysis especially in later postnatal stages, helped in highlighting phenotypes similar to the human disease: decreased survival, generalized tonic-clonoc seizures, sensorimotor disturbances, and hearing impairment. In a third and final stage, I showed that the targeting of microglia/macrophages, either by acute depletion or by decreasing their activation state, was associated with a prevention against the spreading of CMV infection in the developing brain, and against most postnatal clinical manifestations.. Overall, these data confirm the altered state of BIS as a consequence of CMV infection of the developing brain, and strongly suggest, in the rat model studied here, that the microglia/macrophages system plays critical role in the pathogenesis of neurological manifestations similar to those classically seen after human congenital CMV infection.

LISTE DES ABREVIATIONS

ABR : Auditory brainstern response
AIM : Activation immunitaire maternelle
BHE : Barrière hémato-encéphalique
CCMV : Cytomégalovirus du chimpanzé
CF : Convulsion fébrile
CGE : Couche granulaire externe
CIB : Convulsion infantile bénigne
CMV : Cytomégalovirus
CPA : Cellule présentatrice d'antigène
CP : Plaque corticale
CVB3 : Coxsackie virus B3
DC : Cellules dendritiques
EAE : Encéphalomyélite auto-immune expérimentale
EBV : Virus d'Epstein-Barr
EGFR : Epidermal growth factor receptor
EV-71 : Enterovirus-71
GCV : Ganciclovir
GPCMV : Cytomégalovirus du cochon d'inde
HCMV : Cytomégalovirus humain
HHV : Human herpes virus
HIG : Hyperimmunoglobuline
HSV-1 : Virus de l'herpès simplex
HTLV-1 : Virus T lymphotrophic de type-1
IC : Intracérébral
ICV : Intracérébroventriculaire
IFN : Interféron
Ig : Immunoglobuline
IL-6 : Interleukine 6
IL-1b : Interleukine 1 bêta
IRM : Imagerie par résonance magnétique
LCR : Liquide céphalo-rachidien
LPS : Lipopolysaccharide
LT : Lymphocyte T
MCMV : Cytomégalovirus murin
MHV : Virus de l'hépatite murine
ML : Couche moléculaire
MO: Moelle osseuse
NGF: Nerve growth factor
NK : Natural killer
NO: Oxyde nitrique
NOS2: NO-syntase 2
PC : Plexus choroïde
PC : Paralysie cérébrale
PRR : Pattern recognition receptor
RCIU : Retard de croissance intra-utérin
RCMV : Cytomégalovirus de rat
RhCMV : Cytomégalovirus du rhesus
SEP : Sclérose en plaque
SIDA : Syndrome d'immunodéficience acquise
SNC : Système nerveux central
SNP : Système nerveux périphérique
SVZ : Zone sous-ventriculaire
TLR : Récepteur Toll-like
TMEV : Virus de l'encéphalomyélite murine de Theiler
VCML : Virus de la chorioméningite lymphocytaire
VGCV : Valganciclovir
VHC : Virus de l'hépatite C
VIH : Virus de l'immunodéficience humaine
VIS : Virus de l'immunodéficience simienne
VNO : Virus du Nil occidental
VSV : Virus de la Stomatite vésiculaire
VZ : Zone ventriculaire
VZV : Virus de la varicelle-zona

LISTE DES FIGURES

Figure 1. Les différentes voies d'entrée des virus dans le SNC
Figure 2. Dissémination virale au sein du SNC.
Figure 3. Contrôle d'une infection virale cérébrale par le système immunitaire
Figure 4. Frise temporelle du développement cérébral chez l'homme
Figure 5. Mécanismes potentiels responsables des effets pathogènes d'une infection maternelle sur le développement fœtal
Figure 6. Représentation schématique de la transmission verticale du CMV et ses conséquences pathologiques.
Figure 7. Examens d'imagerie de fœtus infectés par le CMV.
Figure 8. Imagerie cérébrale de trois enfants symptomatiques pour une infection congénitale à CMV.
Figure 9. Structure d'un virion
Figure 10. Immunohistochimie anti-GFAP et anti CMV montrant l'infection d'un astrocyte au niveau de la zone subventriculaire d'un cerveau fœtal humain.
Figure 11. Immunohistochimie anti-Iba1 et anti-CMV montrant une cellule microgliale ou macrophage infecté dans le cerveau d'un fœtus humain
Figure 12. Cycle de réplication du HCMV.
Figure 13. Représentation schématique de l'infection par le CMV au cours des différentes étapes du développement cérébral
Figure 14. Représentation schématique des mécanismes physiopathologiques possible au cours des infections congénitales à CMV
Figure 15. Les différents types de cellules myéloïdes du SNC.
Figure 16. Développement embryonnaire de la microglie chez la souris.
Figure 17. Morphologie des cellules microgliales en fonctions de leur état d'activation
Figure 18. Phénotypes polarisées de la microglie et des macrophages
Figure 19. Site cérébraux potentiels permettant l'accès au SNC par les cellules immunitaires périphériques.
Figure 20. Dialogue entre les lymphocytes T et la microglie
Figure 21. Représentation schématiques des principales populations de monocytes chez l'humain la souris et le rat
Figure 22. Evolution de la cinétique cellulaire d'infiltration dans le cerveau infecté par le MCMV
Figure 23. Schéma bilan de l'organisation de la réponse immunitaire cérébrale à une infection néonatale par le MCMV et son évolution postnatale.

LISTE DES TABLEAUX

Tableau 1. Caractéristiques de différents virus neurotropes impliqués dans les pathologies de SNC
Tableau 2. Permissivité des cellules cérébrale au HCMV
Tableau 3. Les modèles animaux d'infection congénitale par le CMV
Tableau 4. Les principaux modèles murins d'infection congénitale à CMV
Tableau 5. Marqueurs protéiques des cellules microgliales et des macrophages utilisés en immunohistochimie et/ou cytométrie de flux.
Tableau 6. Nouvelle nomenclature de la polarisation de la microglie et des macrophages

AVANT-PROPOS

L'infection congénitale par le cytomégalovirus (CMV) représente la première cause d'anomalie neurodéveloppementale. Environ 5 à 10% des nourrissons infectés *in utero* présentent des pathologies néonatales sévères à la naissance, et 10 autres % développeront des séquelles neurologiques (crise d'épilepsie, retard mental, paralysie cérébrale), et sensorielles (surdité de perception, perte de vision). Malgré l'importance des handicaps neurologiques à court et à long terme liés au CMV, la physiopathologie de ces infections reste mal connue.

Un certain nombre de modèles animaux, majoritairement murins, a ouvert la voie vers la compréhension des mécanismes qui sous-tendent la pathogenèse de ces infections au cours du développement cérébral. Des études récentes ont mis l'accent sur l'importance des processus immunitaires cérébraux et sur l'intervention du système immunitaire périphérique dans le contrôle de l'infection au sein du cerveau en développement. Cependant, la réponse du système immunitaire cérébral (SIC), notamment de la microglie et des macrophages, est encore mal comprise et la contribution de ces cellules dans la pathogenèse de ces infections, en particulier *in utero*, reste évasive.

Ce travail de thèse a pour objet la compréhension du rôle joué par le SIC dans les étapes initiales de l'infection cérébrale *in utero* par le CMV, à l'aide d'un nouveau modèle développé chez le rat.

Dans un premier temps, une introduction générale présentera le lien entre infections virales et pathologie du système nerveux. Je traiterai ensuite plus spécifiquement des infections congénitales à CMV et des connaissances issues de l'étude des différents modèles animaux rapportés, en particulier murins. J'aborderai aussi les caractéristiques immunobiologiques de ces infections et plus spécifiquement le rôle possible joué par la microglie et les cellules immunitaires périphériques au cours du processus infectieux.

Dans un deuxième temps, je présenterai les résultats obtenus au cours de ma thèse.

Le premier volet de mes travaux a tout d'abord consisté à créer, décrire et valider un nouveau modèle animal d'infection *in utero* par le CMV chez le rat.

Dans un deuxième volet, je présenterai les stratégies expérimentales complémentaires que nous avons utilisées visant à cibler plus spécifiquement la microglie et les macrophages afin d'en tester les effets sur la dissémination virale et sur ses conséquences, notamment sur le plan neurologique.

Les résultats de ces travaux, leur portée et leurs possibles développements futurs, seront ensuite commentés dans une discussion plus générale.

Enfin, en annexe, figureront sous forme de plusieurs articles publiés ces dernières années, des travaux auxquels j'ai contribué en parallèle de mon sujet principal, de manière prépondérante (démonstration du rôle du gène PRRT2 dans les migraines hémiplégiques) ou plus secondaire.

Les travaux de cette thèse ont pu être réalisés grâce au soutien de l'INSERM, de l'ANR (Agence Nationale de la Recherche; grant EPILAND ANR-2010-BLAN-1405 01), du Conseil Régional Provence Alpes Côte d'Azur. J'ai personnellement été financé INSERM/région pendant les trois premières années, puis durant la quatrième année par un financement de la Fondation pour la Recherche Médicale (FRM, grant FDT20140930813).

INTRODUCTION

I) Contribution des infections virales dans l'étiologie des maladies neurologiques.

Les infections virales du système nerveux central (SNC), si elles sont dans la majorité des cas associées à des pathologies relativement bénignes, peuvent aussi avoir des conséquences dramatiques. Leur compréhension est donc d'une importance de premier plan en raison de leur caractère potentiellement mortel et au regard des altérations neurologiques qu'elles peuvent engendrer. La pathogenèse des infections virales est considérée comme multifactorielle. Ainsi, de nombreux facteurs comme l'âge, le statut immunitaire, le fond génétique ou encore les pratiques culturelles peuvent influencer les manifestations cliniques de ces infections, en influençant par exemple la charge virale présente dans l'organisme, ou encore le tropisme cellulaire du virus. Ces infections peuvent avoir pour conséquence une inflammation du parenchyme cérébral - on parle alors d'encéphalite virale -, ou des méninges - dans le cas d'une méningite virale.

Les encéphalites virales peuvent être classées en deux catégories (Tunkel et al. 2008) :

- Les encéphalites dites primaires qui résultent de l'entrée du virus dans le SNC, et où les altérations causées sont en lien avec la dissémination virale et la réponse immunitaire concomitante de l'infection.
- Les encéphalites qualifiées de post-infectieuses ou para-infectieuses : Elles sont temporellement associées à une infection systémique, mais sans preuve d'une invasion virale directe du SNC. Les conséquences délétères de ces infections secondaires au niveau du SNC surviennent généralement dans le mois qui suit la primo-infection et sont le résultat d'une activation immunitaire périphérique et de phénomènes inflammatoires (Bennetto & Scolding 2004).

Au-delà de ces encéphalites virales caractérisées par une apparition relativement rapide des symptômes, les infections virales cérébrales sont depuis longtemps suspectées d'être responsables d'un nombre important de troubles neuropsychiatriques dont le déclenchement peut parfois prendre plusieurs années ((Crow 1978); (Yolken & Torrey 1995). En particulier, les infections virales survenant au cours du développement cérébral *in utero* semblent jouer un rôle dans l'incidence de diverses pathologies à composante neurodéveloppementale (Labouesse et al. 2015).

Cependant, le lien de causalité entre infection virale et diverses pathologies du SNC est très difficile à établir en raison de la diversité des infections virales, de la complexité des mécanismes physiopathologiques mis en jeu par les virus et de la variabilité des réactions inter-individuelles à ces infections.

Le tableau ci-dessous résume les propriétés de sept virus neurotropes, qui seront notamment abordés dans ce chapitre et qui sont suspectés d'être impliqués dans certaines affections du SNC.

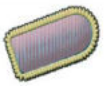
							
Name	**CMV**	**HSV**	**Rabies**	**HIV**	**Polio**	**WNV**	**LCMV**
Virus family	Beta herpesvirus	Alpha herpesvirus	Rhabdovirus	Retrovirus	Picorna virus	Flavivirus	Arenavirus
Genome	(+) DNA Double-stranded linear	(+) DNA Double-stranded linear	(–) RNA Single-stranded linear	(+) RNA Single-stranded linear (2x)	(+) RNA Single-stranded linear	(+) RNA Single-stranded linear	(+/–) RNA Ambisense single-stranded circular
				 Homodimer			
Genome size	235 kb	152 kb	11 kb	9.2 kb	7.5 kb	11 kb	3.5+7 kb[c]
Number of genes	>100	~100	5	9	1[d]	1[d]	2+2[c]
Virus size	~200 nm	~200 nm	75×180 nm	100 nm	28 nm	45 nm	50–200 nm
Envelope	Yes	Yes	Yes	Yes	No	Yes	Yes
Route of brain entry	Cell-mediated BBB crossing	Trigeminal nerve Olfactory nerve	Retrograde axonal	Cell-mediated BBB crossing	Retrograde axonal BBB crossing	Direct BBB crossing	BBB crossing
Neurological	Deafness Developmental brain defects Encephalitis Epilepsy Guillain–Barre syndrome Retinitis	Encephalitis Herpetic neuralgia Meningitis Myelitis	Guillain–Barre-like syndrome Progressive encephalitis Paralysis	Dementia Encephalitis Myelitis Neuropathy	Paralysis Respiratory arrest	Encephalitis Meningitis Myopathy	Developmental brain defects Encephalitis Hydrocephalus Meningitis

Tableau 1. Caractéristiques de différents virus neurotropes impliqués dans les pathologies de SNC (D'après Van den Pol et al, 2006).

Dans cette première partie de l'introduction, nous exposerons dans un premier temps, différents arguments qui démontrent la complexité du lien entre infections virales et pathologie du SNC ; dans un deuxième temps, nous traiterons plus spécifiquement des infections virales survenant au cours du développement cérébral, et qui sont associées à divers troubles neurologiques.

1. Infections virales et pathologies du SNC : Un lien de causalité complexe à établir

a. Accessibilité des virus au SNC

Un des premiers arguments démontrant la complexité du lien entre infection virale et troubles neurologiques concerne les moyens utilisés par les virus pour accéder au SNC. Il est important de noter que les infections virales du cerveau adulte sont beaucoup moins fréquentes que celles des autres organes et vont dépendre de nombreux paramètres comme : la perméabilité des barrières vasculaires, la réponse du système immunitaire (SI) systémique, le tropisme du virus pour les cellules nerveuses du système nerveux périphérique (SNP) ou pour les cellules immunitaires circulantes.

i. Les voies d'entrée des virus au sein du SNC

La diffusion des virus depuis la circulation sanguine systémique vers le parenchyme cérébral est limitée par la présence de la barrière hémato-méningée (BHE). Cette barrière est principalement composée de cellules endothéliales, de péricytes, d'astrocytes, de cellules microgliales et macrophages juxtavasculaires, et d'une membrane basale (**Figure 1A**). Elle intervient dans l'homéostasie du SNC en servant de véritable "bouclier" contre les agressions biologiques ou chimiques, et permet également la diffusion contrôlée d'éléments cellulaires et moléculaires. Ce qui fait la perméabilité de cette barrière, c'est la présence de jonctions serrées entre les cellules endothéliales non fenêtrées qui permet de limiter le passage des cellules, virus, bactéries ou grosses molécules depuis la lumière vasculaire vers le SNC.

En dépit de la présence de cette barrière, les virus ont développé de multiples stratégies pour la traverser et pénétrer dans le SNC. Certains virus peuvent infecter les cellules endothéliales et causer une rupture des jonctions serrées pour accéder au SNC. A titre d'exemple, le virus du Nil occidental (VNO) (Roe et al. 2012), le virus de l'hépatite C (VHC), (Fletcher et al. 2012), le virus JC (Chapagain et al, 2008) ou encore le virus d'Epstein Barr (EBV) (Casiraghi et al. 2011), peuvent directement infecter les cellules endothéliales de la BHE et libérer leurs virions dans l'environnement cérébral. Certains virus, comme le virus de la rage, vont induire une réaction inflammatoire caractérisée par une infiltration de cellules immunitaires dans le parenchyme cérébral, pouvant être à l'origine de la rupture de la BHE. (Chai et al. 2014).

L'accès des virus au SNC peut également se faire par contournement de la BHE. Pour cela, une des méthodes employée est celle visant à infecter les leucocytes circulants afin d'infiltrer le parenchyme cérébral. Ce mécanisme de subversion virale connu sous le nom de « Cheval de Troie » permet aux virus d'échapper au SI et de traverser sans encombre la BHE **(Figure 1A).** L'infection des monocytes et/ou des macrophages est considérée comme un des mécanismes majeur utilisé par les lentivirus, notamment le virus de l'immunodéficience simienne (Clay et al. 2007) (VIS), le VIH (Alexaki et Wigdahl, 2008) et le virus T Lymphotropique de type 1 (HTLV-1). Le CMV est également suspecté d'utiliser cette méthode pour faciliter sa dissémination (Slavuljica et al. 2014).

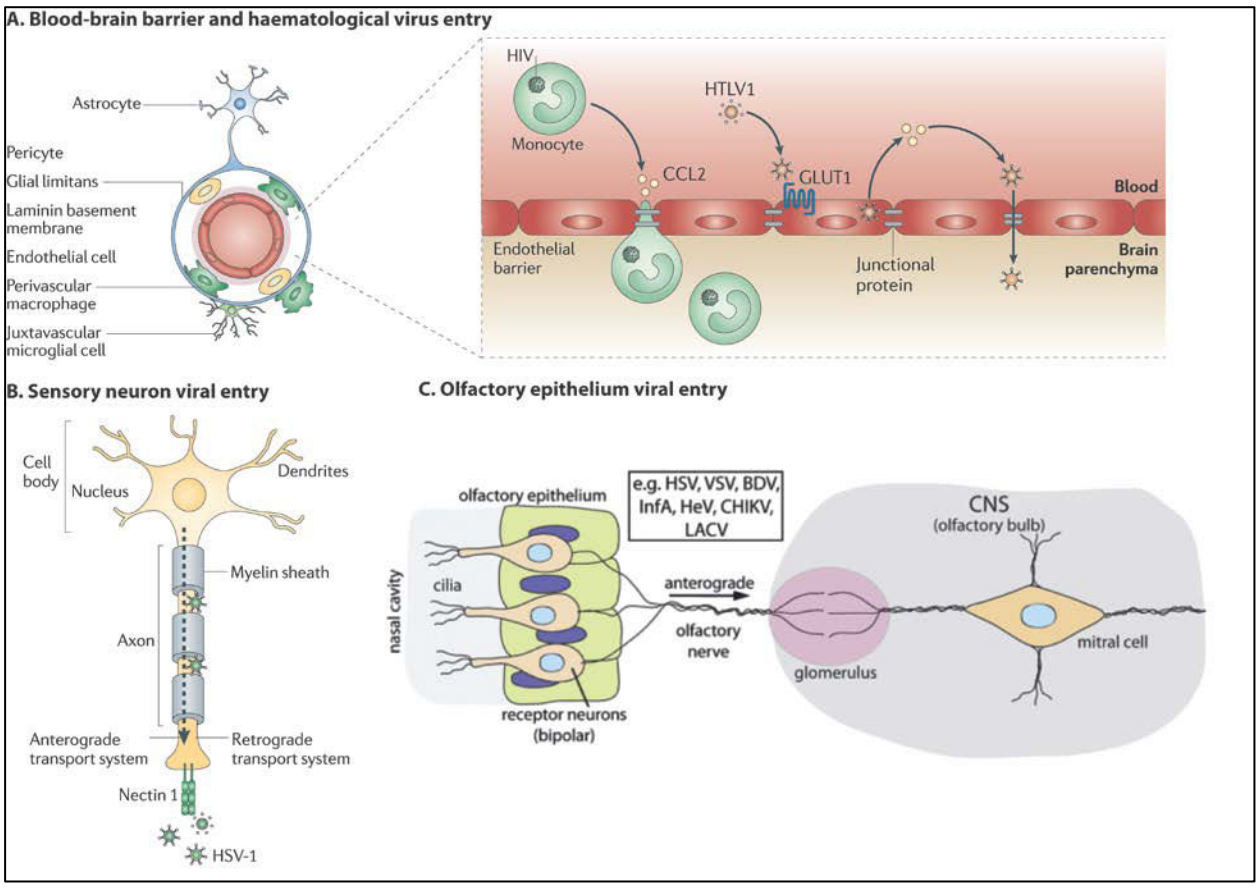


Figure 1. Les différentes voies d'entrée des virus dans le SNC (Adapté à partir de McGavern & Kang, 2011 et Koyuncu, Hogue, & Enquist, 2013).

Certains virus de la famille des Herpès, notamment les HSV-1 et HSV-2 et le virus de la varicelle-zona (VZV) utilisent les terminaisons sensorielles ou motrices des neurones du SNP comme moyen de transport vers le SNC **(Figure 2B)**. Dans le cas des virus de l'herpès, la molécule d'adhérence cellulaire Nectin-1 fait office de récepteur (Smith 2012).

Les particules virales fusionnent ensuite avec la membrane cellulaire de la terminaison axonale et sont déplacées vers le corps cellulaire par transport axonal rétrograde.

Le système olfactif est également une porte d'entrée utilisée par les virus neurotropes (**Figure 2C**). L'avantage de ce système est qu'il permet un accès direct des virus au SNC, via les dendrites des neurones bipolaires localisées dans l'épithélium du nasopharynx. Les nerfs olfactifs appartenant au SNP se connectent ensuite aux interneurones du bulbe olfactif au niveau du SNC. Bien que l'épithélium olfactif bénéficie d'une protection optimale, notamment grâce au mucus s'opposant au passage des micro-organismes, les modèles animaux ont confirmé que cette voie d'entrée était employée par certains virus. C'est par exemple le cas du HSV-1, du VSV, de la rage, du virus de la grippe A et des prions (Mori et al. 2005).

ii. Cibles cellulaires et dissémination au sein du SNC

Les virus peuvent infecter une grande variété de types cellulaires au sein du SNC. Le SNC est principalement composé de deux types cellulaires : les neurones et les cellules gliales. Ces dernières sont constituées par les astrocytes, les oligodendrocytes et la microglie. Comme nous l'avons évoqué précédemment, les cellules endothéliales, constituant majeur des barrières vasculaires sont également une cible privilégiée des virus.

La susceptibilité des cellules du SNC aux infections virales dépend de nombreux paramètres comme, le type de virus et sa souche, le degré de différenciation des cellules et leur permissivité. Les modèles animaux ont pu mettre en évidence que certains virus possédaient des cibles cellulaires bien spécifiques au sein du cerveau immature, qui sont, pour une même voie d'administration, différentes de celles du cerveau adulte. Comme nous l'aborderons plus loin dans le cadre du CMV, il existe souvent une discordance, en terme de tropisme viral cérébral, entre les données issues des études *in vitro* et celles issues des études *in vivo.*

Dans le cas d'une infection neuronale, les virus utilisent différentes stratégies pour se propager de cellules en cellules. Certains virus non enveloppés comme le virus de l'encéphalomyélite murine de Theiler (TMEV) ou le virus de la Rougeole sont capables de se propager de proche en proche lorsqu'il existe un contact entre les cellules et par voie trans-synaptique (Martinat et al. 1999) , (Lawrence et al. 2000), (Ehrengruber et al. 2002). D'autres virus comme le CMV et le VSV se propagent majoritairement de proche en proche ou par diffusion au sein du LCR. Les alpha-herpès virus utilisent le système de transport antérograde axonal pour migrer depuis le corps cellulaire vers l'extrémité de l'axone et infecter les cellules adjacentes (Diefenbach et al. 2008), (Curanovic & Enquist 2009) (**Figure 2**). A l'inverse, le virus de la rage est transporté de manière rétrograde depuis la synapse vers le corps cellulaire et infecte l'axone du neurone adjacent par voie dendritique (Dietzschold et al. 2008) (**Figure 2**).

Les virus qui pénètrent dans le SNC peuvent également exploiter d'autres types cellulaires pour assurer leur dissémination. Par exemple, dans le modèle animal d'infection cérébrale par le MHV, l'inoculation intracrânienne du virus conduit d'abord à l'infection des cellules épendymaires qui bordent les cavités ventriculaires. Secondairement, le virus infecte les astrocytes, les macrophages et la microglie, puis cible les oligodendrocytes (Bergmann et al. 2006).

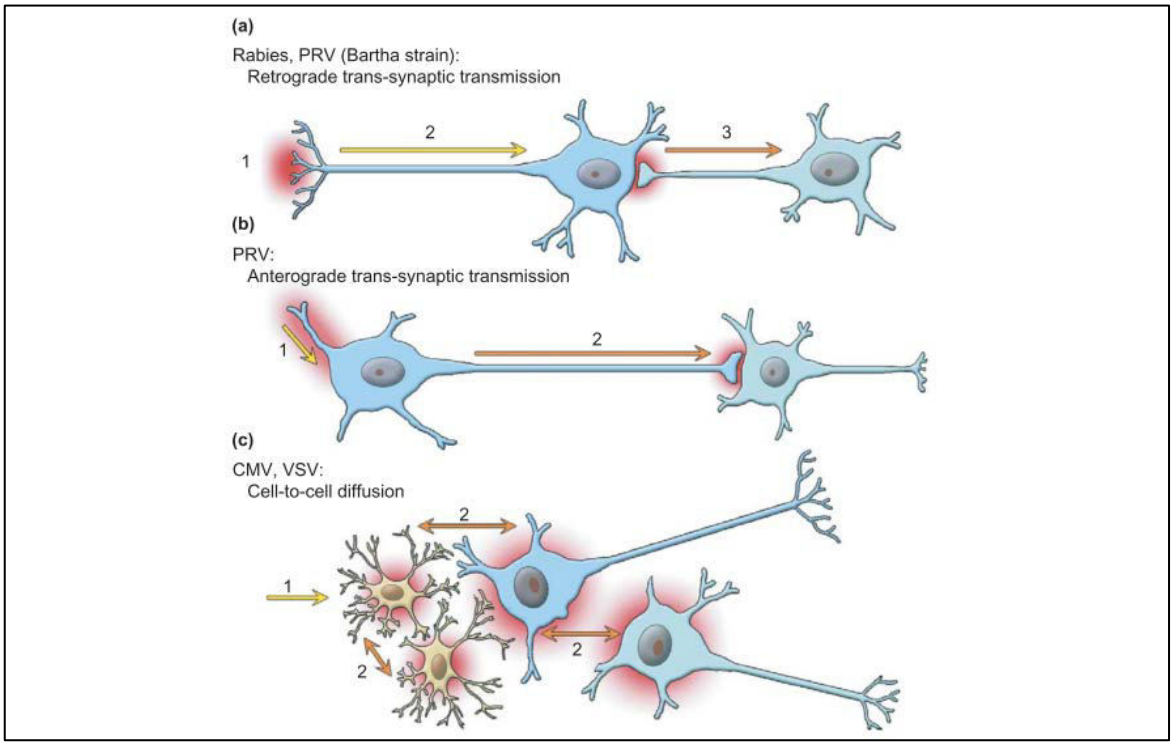


Figure 2. Dissémination virale au sein du SNC. (d'après A. N. van den Pol, 2006)

b. Les altérations au sein du SNC

La dissémination virale au sein SNC est sous la dépendance des réponses immunitaires innées et adaptatives qui visent à lutter contre l'infection et à permettre la survie de l'hôte. Cependant au cours de ce processus de défense les dommages causés par le virus lui-même et ceux causés par le SI peuvent avoir pour conséquence un dysfonctionnement du SNC. Ainsi, les virus peuvent induire des altérations directes en entrainant par exemple la lyse des cellules infectées, ou être responsables de d'altérations indirectes, notamment par le biais de processus neuroinflammatoires (Anthony N. van den Pol 2009), (Terry et al. 2012).

i. Infection lytique et altérations du SNC

La mort cellulaire, qu'elle soit programmée ou non, est une conséquence possible des infections virales du SNC. Bien que le processus de mort cellulaire permette de limiter la réplication et/ou la transmission de certains virus, elle peut constituer un atout essentiel de la dissémination virale qui sera en grande partie responsable des altérations causées au niveau du SNC. Deux voies de mort cellulaires sont possibles : l'apoptose, qui est un processus de mort programmée de la cellule, généralement déclenchée par un stimulus de stress ou une infection. La régulation temporelle de l'apoptose entre dans la pathogenèse de nombreuses infections virales (Hardwick 2001). Certains virus peuvent par exemple inhiber l'induction de l'apoptose afin de garder la cellule hôte en vie le temps de générer suffisamment de virions pour submerger les défenses immunitaires et envahir le tissu infecté. Ces même virus vont ensuite induire l'apoptose à un stade plus tardif pour favoriser leur dissémination tout en limitant la réponse immunitaire (Teodoro & Branton 1997). Le déclenchement de l'apoptose par les virus peut également être une stratégie de dissémination au sein de cellules phagocytaires. Dans le cas de l'infection par le VIH, une étude récente a d'ailleurs montré que les macrophages interviennent dans la dissémination *in vivo* du virus, en phagocytant spécifiquement les lymphocytes CD4+ infectés, notamment ceux en apoptose (Amy E. Baxter et al, Cell host & microbe, 2014). La deuxième voie de mort cellulaire, la nécrose, se caractérise par une rupture de l'intégrité membranaire de la cellule infectée. Cette nécrose est généralement associée à une libération massive des organites de la cellule dans le milieu extracellulaire et entraine des dégâts tissulaires important, souvent de nature inflammatoire. L'induction de la voie apoptotique ou nécrotique dépend souvent du type cellulaire infecté. Par exemple, le virus de la Varicelle induit l'apoptose dans de nombreux types cellulaires comme les fibroblastes, les cellules épithéliales et les cellules mononucléaires. Un autre exemple est celui de l'alpha virus Sindbis : la voie de mort cellulaire engagée par le virus au niveau cérébral dépend du type, de la localisation et de l'état de maturité du neurone infecté (Nargi-aizenman & Griffin 2001).

ii. Réponse immunitaire cérébrale et altérations indirectes du SNC

Les virus peuvent donc avoir un effet lytique sur les cellules cérébrales infectées et entrainer des troubles neurologiques graves parfois mortels. Cependant, les altérations au niveau du SNC peuvent aussi être la conséquence de la réponse du système immunitaire à l'infection. Ainsi, l'infection virale entraine-t-elle une activation de l'immunité innée, qui est peu spécifique de l'élément pathogène mais est programmée pour répondre rapidement à l'agression. L'immunité innée met en jeu des cellules comme les monocytes/macrophages et les cellules dendritiques, et la libération de cytokines produisant une réaction inflammatoire généralement capable de contenir l'infection. Après plusieurs jours, la réponse immunitaire adaptative (acquise) notamment représentée par les lymphocytes, est activée et permet d'éliminer spécifiquement l'infection. Les infections virales qui échappent à ce contrôle local vont se propager dans les autres tissus et provoquer un véritable "orage" de cytokines (*cytokine storm*) consécutif à une augmentation de leurs taux sériques et comprenant des signaux pro et anti-inflammatoires **(Figure 3).** Au niveau du cerveau, ce type de réponse à une infection virale peut être dévastateur et conduire à des méningites, des encéphalites, voire à la mort de l'individu. La réponse immunitaire aux virus est complexe et fait intervenir de nombreux récepteurs impliqués dans la reconnaissance de motifs moléculaires caractéristiques de ces pathogènes. On parle de PRR (*Pattern Recognition Receptor*) pour désigner ces récepteurs, qui sont exprimés par toutes les cellules de l'immunité innée notamment par les macrophages, les cellules dendritiques et microgliales. Parmi ces PRR, on trouve les récepteurs Toll-like (TLRs), les récepteurs de type NOD, les récepteurs RIG-1, ainsi que les récepteurs Lectin de type C.

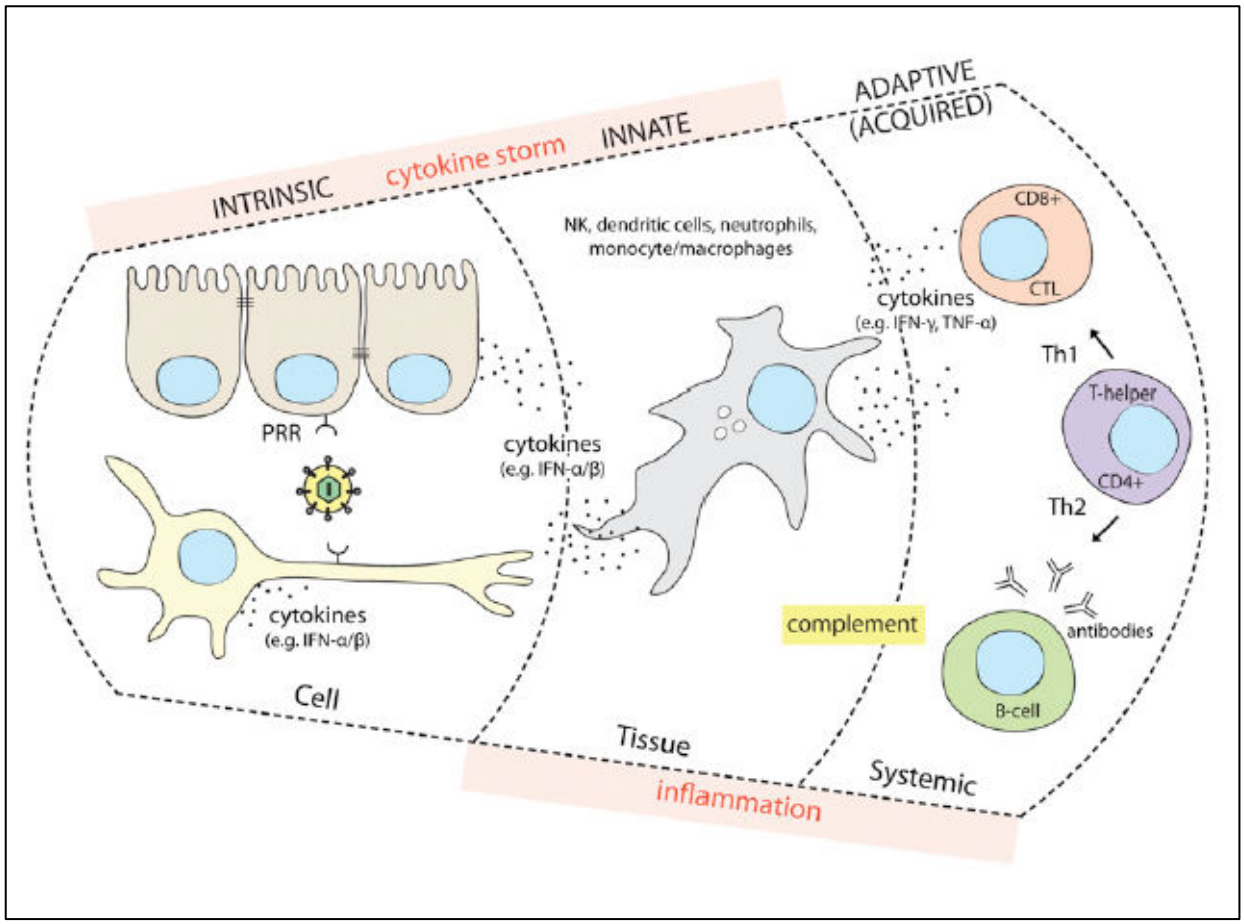


Figure 3. Contrôle d'une infection virale cérébrale par le système immunitaire (D'après Koyuncu et al., 2013)

Les molécules présentes à la surface des virus vont être reconnues par les PRR. Cette reconnaissance induit la synthèse de nombreuses protéines anti-virales et de cytokines comme les interférons de type I (IFN-alpha/bêta) impliqués dans le phénomène de résistance intrinsèque à l'infection, en empêchant la réplication virale. Si les défenses constitutives ne suffisent pas à limiter l'infection, les cytokines et les cellules infectées en apoptose induisent l'activation des cellules sentinelles de l'immunité innée comme les neutrophiles et autres granulocytes, les monocytes/macrophages/cellules dendritiques et les Natural Killers (NK). L'hyperactivation de cette réponse immunitaire peut être responsable de l'orage de cytokine et causer des pathologies inflammatoires. Ces cellules de l'immunité innée vont à leur tour induire une libération de chimiokines et de cytokines impliquées dans l'activation des lymphocytes T (LT) permettant la mise en place de l'immunité acquise qui est au contraire lente mais très spécifique du pathogène. Deux types de réponses interviennent : la Th1, mettant en jeu les LT CD4+ « helpers » et les CD8+ cytotoxiques, qui jouent un rôle majeur dans la destruction des cellules infectées. La réponse Th2 est une réponse humorale faisant intervenir les CD4+ helpers et les lymphocytes B producteurs d'anticorps spécifiques dirigés contre le pathogène.

Ce sont les cascades de signalisation intracellulaires déclenchées par l'activation de ces récepteurs qui permettent de coordonner l'élimination des pathogènes ainsi que des cellules infectées. Cependant, une activation aberrante de ce système peut être à l'origine d'une mauvaise régulation du SI responsable de phénomènes inflammatoires pouvant causer des dégâts tissulaires **(Figure 3)** (Pour revue : (Takeuchi & Akira 2010)). Dans l'étude de Butchi et al ((Butchi et al. 2011)), il est décrit que l'activation des récepteurs TLR-7 et TLR-9, qui sont respectivement sensibles aux virus à ARN et à ADN, induit une réponse inflammatoire cérébrale. De plus cette réponse inflammatoire est strictement dépendante du récepteur activé. Dans les cas des TLR-9, des cytokines vont être libérées entrainant un recrutement de cellules inflammatoires dans le SNC. L'activation spécifique des TLR-7 induit une forte expression d'Interferon Beta (IFN-bêta) qui a des conséquences modérées sur l'inflammation cérébrale.

Les cytokines pro-inflammatoires peuvent ainsi causer des dysfonctions neuronales ou potentiellement la mort de ces cellules, et être responsable de l'apparition de troubles neurologiques. De nombreux modèles animaux transgéniques, déficients pour certaines de ces cytokines, confirment le rôle de ces molécules dans les pathologies virales du SNC. Ainsi les souris déficientes pour le gène de l'interleukine 6 (IL-6) présentent-elles beaucoup moins de crises épileptiques que les souris sauvages après infection par le virus de Theiler (Libbey et al. 2011). Les souris KO pour le gène de l'Interleukine 1 Beta (IL-1b) sont résistantes aux encéphalites induites par le virus Sindbis (Liang et al. 1999). Un autre exemple est celui des infections par le virus de l'hépatite murine (MHV), responsable d'encéphalites : les animaux pour lesquels on a invalidé le gène de la NO-synthase 2 (NOS2), notamment impliqué dans l'activation de la microglie et des macrophages et responsable de l'induction de cytokines proinflammatoires, montrent une survie augmentée et une réduction de la mort neuronale (Chen & Lane 2002). Ces médiateurs solubles proinflammatoires peuvent perturber le fonctionnement du SNC par plusieurs mécanismes. Soit par altération directe de l'activité neuronale, par le biais notamment des astrocytes (Vezzani & Viviani 2015) ; soit en induisant une infiltration de leucocytes au sein du SNC, phénomène que nous aborderons plus loin, et qui peut avoir un effet délétère sur le fonctionnement neuronal (Terry et al. 2012).

Aussi, de nombreuses catégories de leucocytes sont connues pour être impliquées dans les processus immuno-pathogéniques à l'origine de troubles neurologiques.

Des études utilisant un anticorps neutralisant dirigé contre la protéine CCL2, ou des souris transgéniques déficientes pour les récepteurs aux chimiokines CCR2 et CCR5 présent sur les monocytes pro inflammatoires, montrent une nette amélioration du pronostic des animaux infectés notamment par le virus de l'encéphalite murine de Theiler (TMEV) (Bennett JL et al, J Virol, 2007), le MHV (Glass et al. 2001), et le Virus du Nil Occidental (VNO) (Getts et al. 2008).

c. Variabilité interindividuelle des infections virales cérébrales

La compréhension du rôle des virus dans les maladies neurologiques est également complexifiée par l'existence d'une grande variabilité interindividuelle. En effet, un même virus peut agir de manière totalement différente - et en quelque sorte imprévisible - d'un individu à l'autre, par exemple en infectant différentes régions du cerveau, à l'origine d'une symptomatologie hétérogène, provoquant des troubles neurologiques seulement chez une partie des personnes infectées.

i. Beaucoup d'individus infectés, mais peu sont symptomatiques

L'infection par le virus de la Poliomyélite illustre très bien ce phénomène. Même si ce virus a pu être en grande partie éradiqué grâce aux larges campagnes de vaccination, il subsiste encore quelques régions du monde touchées par ces infections, notamment en Inde et en Afrique du Nord (Tyler 2010). Bien qu'un nombre important d'individus soit infecté, il est important de noter que les symptômes neurologiques caractéristiques de la Poliomyélite, comme la paralysie motrice sont observés seulement dans moins de 1% des cas (Van den Pol, 2006). En effet, le virus de la Polio possède avant tout un tropisme privilégié pour le système gastro-intestinal qui constitue une première barrière immunitaire efficace s'opposant à la réplication du virus et à son passage dans la circulation sanguine ce qui limite considérablement ses possibilités d'envahir le SNC (Pfeiffer 2011). De façon similaire, les infections par le VNO connues pour être responsables d'encéphalite et de méningite, n'induisent pas de symptômes chez la grande majorité des individus infectés.

ii. Un virus, plusieurs pathologies du SNC; et une pathologie du SNC, plusieurs virus.

Le paradigme de Koch affirme qu'une maladie est spécifiquement associée à un organisme pathogène. Cependant, cette règle ne s'applique généralement pas pour les virus.Tout d'abord parce qu'un même virus peut être à l'origine d'une grande variété de troubles neurologiques. Les infections par le virus coxsackie, un membre de la famille des entérovirus, sont notamment impliquées dans la survenue de méningite et d'encéphalite du nourrisson (Feuer et al. 2003), mais ont également été associées à l'apparition de sclérose latérale amyotrophique chez certains patients (Woodall et al. 1994).Le VIH peut également être lié à de nombreux syndromes neurologiques, soit par atteinte directe du SNC, soit en favorisant l'infection du cerveau par des pathogènes opportunistes. Ainsi, le VIH peut être à l'origine d'un spectre assez large de neuropathologies telles que des myélopathies, des neuropathies sensorielles ou des démences (J.C. et al. 2005).

D'autre part, une même pathologie touchant le SNC pourrait bien être influencée par différents virus. Ce pourrait être le cas de la sclérose en plaque (SEP), pour laquelle des interventions virales sont suspectées. Un des arguments qui plaide en faveur d'une cause virale de la SEP est la présence de bandes oligoclonales d'Immunglobuline G dans le cerveau et le LCR de patients atteints de SEP. En effet, ces bandes semblent être fréquemment retrouvées en cas d'infection virale du SNC (Gregory P. Owens et al. 2011). La SEP est caractérisée par l'altération progressive de la myélinisation des axones perturbant la communication électrique entre les neurones. Cette pathologie est généralement associée à une réaction auto-immune suspectée d'être responsable de l'attaque de la myéline par le système immunitaire. De nombreux virus sont soupçonnés d'être impliqués dans l'étiologie de la SEP, comme le virus de l'Herpès Simplex, (HSV-1) l'Herpès virus 6, le virus de la Rougeole, le virus d'Epstein-Barr (EBV) ou encore le CMV.(Pender & Burrows 2014), (Gregory P Owens et al. 2011)

iii. Génétique et infections virales

La génétique représente un paramètre qui conditionne en partie la survenue des infections virales cérébrales. D'une manière générale, le fond génétique entre en ligne de compte en conférant d'un individu à l'autre une susceptibilité plus ou moins accrue aux infections virales. Par exemple, des gènes prédisposant à un système immunitaire répondant efficacement à une infection virale vont faciliter l'élimination du virus de l'organisme.

Un exemple flagrant est celui de la lignée de souris C57/BL6. Cette dernière est particulièrement résistante aux infections par le CMV, ce qui n'est pas le cas pour la lignée Balb/c qui elle y reste sensible. Cette différence semble résider dans la mutation d'un gène codant pour une lectine, impliquée dans le processus d'activation des cellules *natural killers* (NK)(Lee et al. 2001). Un autre exemple concernant la souche virale elle-même est celui de la glycoprotéine Gp40 du CMV murin (MCMV), qui confère également au virus une résistance contre les lymphocytes cytotoxiques CD8+ et les NK.(Krmpotić et al. 2002). Le même phénomène de susceptibilité génétique aux infections virales est retrouvé chez l'homme. Ainsi les individus porteurs d'une variation génétique du récepteur de la chimiokine CCR5, qui est un co-récepteur impliqué dans l'entrée du virus de l'immunodéficience humaine (VIH), montrent un risque significativement plus faible de développer un syndrome d'immunodéficience acquise (SIDA). Notons d'ailleurs que dans le cas des infections par le VNO, les variations de ce récepteur sont au contraire associées à une augmentation du risque de développer une encéphalite liée à cette infection virale cérébrale.

Les infections virales pourraient également constituer des éléments environnementaux susceptibles de participer à des pathologies cérébrales ayant également une composante génétique (Persico & Bourgeron 2006), Abelson et al 2005, (Hardy & Selkoe 2002). Par ailleurs, la génétique et les infections virales peuvent avoir des points de convergences sur le plan physiopathologique. Ainsi, certains syndromes d'origine génétique sont cliniquement indissociables de pathologies induites par une infection virale. C'est notamment le cas du syndrome autosomique récessif d'Aicardi-Goutière (encéphalopathie infantile chronique) dont les caractéristiques cliniques et immunologiques rappellent celles des infections congénitales par le CMV ; des mutations dans le gène codant pour la sous-unité de la ribonucléase H2 ont été identifiées dans cette pathologie. Cette ribonucléase jouerait un rôle antiviral en dégradant les hybrides ADN-ARN formés lors de la réplication des rétrovirus (Crow et al. 2006). Un autre exemple est celui concernant les mutations perte de fonction du gène codant pour la glycoprotéine RNASET2, associée à la leuco-encéphalopathie kystique ; cette pathologie autosomique récessive est, sur le plan clinique, non distinguable des infections congénitales à CMV. La déficience en protéine RNASET2 semblerait altérer le développement cérébral et la myélinisation par le biais notamment de l'angiogenèse. De son côté le CMV, de par son implication dans les pathologies vasculaires chroniques et son tropisme pour les cellules endothéliales, est suspecté d'être à l'origine d'une hypoperfusion du cerveau fœtal (Henneke et al. 2009).

Un autre exemple, là aussi relatif au CMV, est celui des polymicrogyries péri-sylviennes, qui sont clairement d'origine génétique pour une partie d'entre elles, et d'origine virale congénitale pour d'autres (Barkovich 2010).

Nous verrons plus loin que certaines convulsions infantiles bénignes afébriles, qui peuvent être causées par des mutations du gène *PRRT2* (Cloarec et al. 2012) (**voir aussi en Annexes)**, surviennent aussi dans le contexte de gastro-entérites causées par le rotavirus, un virus neurotrope de la famille des entérovirus (Espeche & Caraballo 2010).

d. Effets "à retardement" des infections virales (infections au cours de l'enfance ou de la vie intra-utérine)

Les infections virales peuvent également induire des troubles neurologiques des années voire des décennies après la primo-infection. Certains virus comme ceux de la famille des Herpès ont la possibilité de rester latents dans les neurones périphériques et ne se réactivent qu'en présence d'un stimulus spécifique.

Ainsi le HSV-1 peut-il se réactiver après une exposition aux ultraviolets, l'administration d'adrénaline, lors d'une d'hyperthermie ou au cours d'un stress psychosocial (Schleiss 2009). Une des complications neurologiques majeures qui peut résulter de la réactivation du HSV-1 est l'encéphalite herpétique pouvant causer de sérieuses séquelles cérébrales (crises d'épilepsies, aphasie, déficit moteur) et même la mort de l'individu.

Le HHV-6 peut rester quiescent dans les cellules de la lignée myéloïde comme les monocytes et les macrophages (Kondo et al. 1991) et des phénomènes de réactivation dans les cellules mononucléaires recrutée dans le SNC ont été reportés chez des patients atteints de pathologies neuroinflammatoires (Horvat 2013). La réactivation du HHV-6 est notamment associée à des altérations de la myéline. Les HHV-6 induisent l'expression de cytokines pro inflammatoires qui ont un effet cytotoxique pour les oligodendrocytes, (Kong et al. 2003) induisent de l'apoptose, et perturbent le cycle cellulaire des précurseurs gliaux nécessaires aux processus de remyélinisation (Dietrich et al. 2004).

La réactivation du virus de la varicelle au niveau des neurones du SNP cause généralement le zona, dermatose caractérisée par des éruptions cutanées de topographie métamérique. Cependant, dans certains cas, le zona peut avoir pour conséquence l'apparition de douleurs chroniques et provoquer des méningites et des encéphalites non accompagnées de manifestations cutanées (Don Gilden, Randall J. Cohrs, Ravi Mahalingam 2010).

Outre le phénomène de réactivation, certain virus peuvent laisser une empreinte latente au niveau du SNC capable de causer des dysfonctions neurologiques à retardement, bien que le virus ne soit plus détectable dans le cerveau. C'est par exemple le cas du syndrome post-poliomyélite caractérisé par une nouvelle manifestation des symptômes de la polio parfois des décennies après l'épisode infectieux primaire. Ce phénomène résulterait de processus de dégénérescence des axones néoformés au cours de la récupération post-lésionnelle concomitante à l'infection initiale, entrainant des déficiences de la transmission nerveuse au niveau de la jonction neuromusculaire (Lin et al. 2005), (Boyer et al., 2010)

Le cerveau fœtal est extrêmement vulnérable aux agents infectieux. Les infections virales prénatales représentent une cause majeure d'altération du SNC entrainant des troubles neurologiques chez le nouveau-né. Ces infections *in utero* peuvent également être asymptomatiques et faute de dépistage systématique, passer inaperçues pendant une longue période de l'enfance voire jusqu'à l'âge adulte. Ainsi certaines pathologies neurologiques et psychiatriques qui apparaissent à l'âge adulte pourraient être une conséquence à long terme d'une exposition virale prénatale survenant au cours d'une période critique du développement du SNC. De nombreuses études (Boksa 2010),(Meyer et al. 2009), (Meyer et al. 2007), (Meyer 2014) suggèrent que les infections congénitales et les stimuli inflammatoires qui en résultent, joueraient un rôle non négligeable dans l'étiologie de certains trouble neuropsychiatriques. C'est par exemple le cas de la schizophrénie (Alan S. Brown, M.D., M.P.H. and Elena J. Derkits 2010), des syndromes autistiques (Patterson 2011), des troubles bipolaires (Canetta et al. 2014), du retard mental (Johnson, Julie, Brenna Anderson 2012) et de la paralysie cérébrale (Hagberg et al. 2012), (Miller et al. 2013).

2. Infections virales au cours du développement cérébral et pathologies neurologiques

Comme nous l'avons abordé précédemment, de nombreux facteurs déterminent la possibilité qu'ont les virus d'infecter les cellules du SNC. Le degré de maturité du cerveau conditionne aussi le tropisme viral. Certains virus n'ont par exemple qu'un très faible tropisme pour le cerveau adulte mais infectent volontiers le cerveau en développement. Il existerait en effet un phénomène d'âge-dépendance dans la susceptibilité aux encéphalites virales et à leur sévérité ; ces dernières auraient des conséquences plus marquées voire létales lorsqu'elles touchent le sujet jeune (Oliver KR et al, 1997). De plus, les infections touchant le SNC au cours du développement *in utero* sont souvent associées à des troubles neurologiques sévères et représentent une cause majeure de mortalité fœtale et périnatale.

a. Sensibilité du cerveau en développement pour les infections virales.

Le développement cérébral est un processus complexe qui débute très précocement au cours de la vie intra-utérine et se prolonge de longues années après la naissance. Au cours du développement cérébral, les progéniteurs neuraux vont proliférer, migrer au sein de l'architecture cérébrale, se différentier en type neuronal spécifique et établir des connexions synaptiques pour former les futurs réseaux neuronaux matures **(Figure 4).**

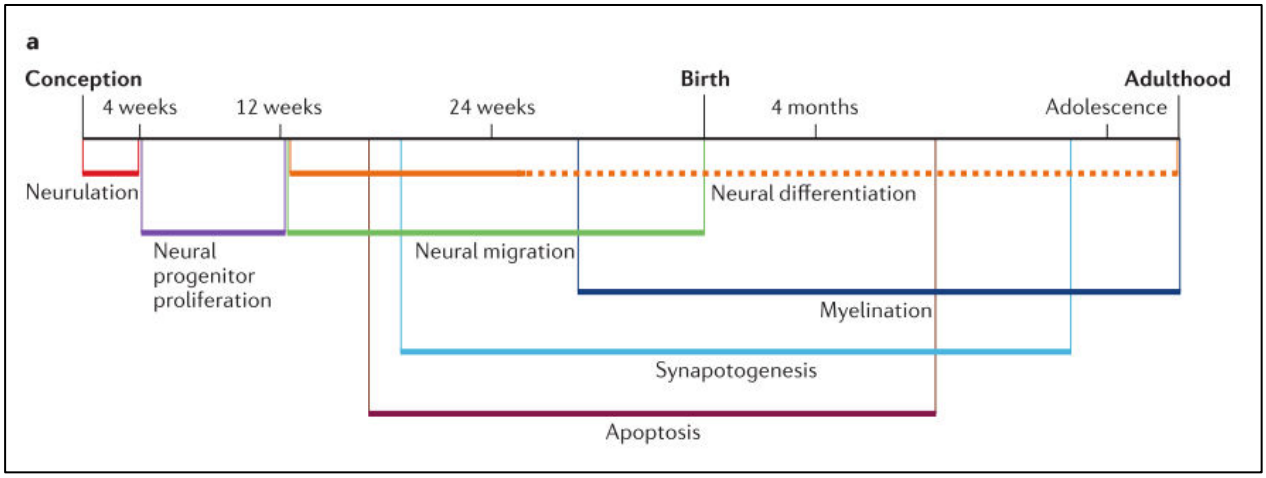


Figure 4. Frise temporelle du développement cérébral chez l'homme. (D'après : Ronan et al. 2013).

Durant cette période le cerveau fœtal est plus sensible aux agressions environnementales et particulièrement aux infections virales.

Le modèle d'infection par le virus de la Stomatite Vésiculaire (VSV) chez le rongeur illustre très bien ce phénomène de sensibilité aux infections virales du cerveau immature. L'inoculation intra-nasale du VSV chez le rat et la souris en période néonatale induit une encéphalite fulminante le plus souvent létale. En revanche, l'infection de ces animaux entre 2 et 3 semaines de vie postnatale altère de manière plus ciblée les systèmes noradrénergique et sérotoninergique ; si elle entraine des troubles comportementaux à long terme, elle reste néanmoins sans conséquences sur le pronostic vital. Quant à l'infection d'animaux adultes, toujours par voie intranasale, elle conduit à l'infection préférentielle des interneurones GABAergiques des bulbes olfactifs, alors qu'aucune dissémination virale dans les autres structures cérébrales n'est observée. Un autre modèle intéressant est celui du Virus de la Chorioméningite Lymphocytaire (VCML). Les rats infectés par le virus pendant les périodes post-natales précoces ont une charge virale cérébrale nettement supérieure à ceux infectés plus tardivement. De plus la microcéphalie causée par l'infection est d'autant plus réduite que l'animal est infecté à des stades post-nataux plus tardifs (Bonthius et al. 2007).

Les mécanismes cellulaires et moléculaires sous-tendant la sensibilité du cerveau immature aux infections virales n'ont pas été complètement élucidés. Dans le cas du VSV, il semblerait que la dissémination du virus au sein du cerveau adulte soit freinée par une signalisation mettant en jeu les Interférons de type I (IFN-1), notamment les IFN Beta. Ces molécules exercent un effet antiviral à distance du foyer de l'infection, s'opposant ainsi à la propagation virale vers d'autres structures cérébrales. De surcroit, en l'absence du récepteur aux IFN-1, les cellules cérébrales montrent une susceptibilité augmentée à l'infection virale cérébrale entrainant des troubles neurologiques et une létalité (van den Pol et al. 2014). De manière intéressante la réponse médiée par les IFN-1 serait atténuée dans le cerveau en développement (van den Pol et al. 2007), probablement en raison d'un système immunitaire encore immature. Mais l'immaturité du SI n'est pas l'unique raison de cette sensibilité du cerveau en développement aux infections virales. En effet, l'identité des cellules cibles du virus conditionne également l'infectivité cérébrale et ce indépendamment d'un SI fonctionnel. Ainsi, les cellules cérébrales immatures notamment les progéniteurs neuraux seraient plus susceptibles aux infections à CMV que les cellules d'un cerveau mature (Van den Pol & Reuter 2002), (Mutnal, Cheeran, et al. 2011).

b. Troubles neurologiques associés à des infections virales au cours de l'enfance

Les infections virales du SNC représentent la principale cause d'encéphalites survenant au cours de l'enfance (Davison & Ramsay 2003). La cause la plus fréquente d'encéphalite est celle liée au virus de l'herpès (HSV) qui dans un tiers des cas concerne les enfants (Baringer, 2008).

La plupart des encéphalites sont dus au HSV de type 1 mais environ 10% d'entre elles sont causées par le HSV de type 2. D'autres virus peuvent induire une encéphalite chez l'enfant immunocompétent. Les plus fréquents sont : le virus VZV (10 à 15%), le virus de l'encéphalite à tique (*Borrelia burgdorfei*), le CMV, l'EBV, les entérovirus, et le virus de la rougeole (Bale 2015). Le virus humain herpès 6 est une cause rare d'encéphalite chez l'enfant immunocompétent, mais une cause fréquente chez l'hôte immunodéprimé (Gilden et al. 2009).

Certaines infections virales survenant au cours de l'enfance ou de la petite enfance ont été associées à la présence de troubles neurologiques, par exemple dans le contexte des convulsions fébriles (CF) ou des convulsions infantiles bénignes (CIB). Les convulsions fébriles sont les crises épileptiques les plus fréquemment observées chez l'enfant de moins de 5 ans. Dans ce contexte, la fièvre occasionnée est dans la majorité des cas d'origine virale. Les enfants, en particulier de moins de 1 an sont plus souvent concernés que les adultes. Parmi les virus les plus fréquemment à l'origine d'épisodes fébriles au cours de l'enfance, on trouve les virus de la Grippe A et B, le rotavirus, l'Herpès virus 6 et les entérovirus.

Par ailleurs, un lien entre certaines infections gastro-intestinales et la présence de crises d'épilepsie a été proposé. En 2001, Lynch et al ont pu détecter la présence d'ARN de rotavirus dans le LCR de deux patients présentant une encéphalopathie avec fièvre et convulsions.(Lynch et al. 2001). Dans une autre étude réalisée sur 22 patients, des CIB ont pu être corrélées à des épisodes de gastroentérite aigue, induits ou non par le rotavirus (Caraballo et al. 2009). De nombreux autres entérovirus sont connus pour infecter le SNC et causer des désordres neurologiques (Rhoades et al. 2011). C'est par exemple le cas de l'enterovirus-71 (EV-71), pathogène responsable du syndrome pieds-mains-bouche. Bien que ces infections soient le plus souvent bénignes, l'EV-71 peut être responsable de complications neurologiques sévères notamment par atteinte de l'hypothalamus, du tronc cérébral et de la moelle épinière (Solomon et al. 2010).

Bien que le tropisme des entérovirus pour les cellules du SNC soit connu (Rhoades et al. 2011), les mécanismes physiopathologiques sous-tendant le développement des troubles neurologiques associés à ces infections ne sont pas élucidés. Sont-ils le résultat d'une atteinte directe des cellules cérébrales par le virus, ou d'un effet indirect via l'activation du système immunitaire ? L'hypothèse d'une susceptibilité génétique est également à prendre en considération : par exemple, plusieurs récepteurs influencent l'entrée du rotavirus dans les cellules-cibles (López & Arias 2004), et on peut supposer que des variations dans les gènes correspondants modulent la susceptibilité virale. Lorsque des défauts génétiques conduisent à des pathologies identiques, ou très similaires, à une infection virale cérébrale, on peut supposer l'existence de voies physiopathologiques convergentes, à un niveau restant à déterminer. Un exemple possible **(voir aussi en Annexes)** est celui du gène *PRRT2* pour lequel des mutations ont récemment été identifiées dans des familles avec CIB. Il pourrait de plus exister un lien mécanistique entre la présence de CIB et les infections à rotavirus (Ishii et al. 2013).

c. Infections virales congénitales et pathologies neurodéveloppementales

De nombreux pathogènes incluant les bactéries, certains parasites, et les virus en font évidemment partie, sont capables d'infecter le fœtus au cours du développement *in utero*, et d'avoir pour conséquences des anomalies développementales. Ces pathogènes présentant un risque pour le fœtus figurent dans un groupe dont l'acronyme est TORCH, pour Toxoplasmose, Other (Syphylis, varicelle-zona, parvovirus B19), Rubéole, Cytomégalovirus et Herpès. Les maladies induites par ces organismes infectieux sont variées, et celles concernant le SNC ont souvent un pronostic sombre. Ces pathologies peuvent parfois être silencieuses à la naissance et ne se manifester que plusieurs mois voire plusieurs années après l'infection. De multiples paramètres vont déterminer l'évolution clinique de ces maladies, comme le temps gestationnel auquel l'infection survient, le type de pathogène impliqué, sa concentration sanguine et son tropisme, la réponse inflammatoire et le statut immunitaire maternel et fœtal. On conçoit ainsi immédiatement la complexité des physiopathologies respectives, et les multiples difficultés de leurs études. A titre d'exemple, les infections par le virus de la rubéole dans les 10 premières semaines de gestation ont un effet tératogène pour les fœtus qui survivent à cet épisode infectieux, caractérisé par des malformations cardiaques, oculaires et du SNC (Webster 1998). Plus tard au cours de la gestation, (entre la 11ème et la 16ème semaine) ces infections induisent des

troubles neurodéveloppementaux comme un retard mental, et des atteintes neurosensorielles comme la surdité (Cradock-watson & Pollock 1982).
Les séquelles associées à ces infections prénatales peuvent parfois se manifester à des stades tardifs de la vie post-natale. Des études ont notamment mis en évidence une augmentation des diabètes insulino-dépendants chez des individus adultes ayant été infectés congénitalement (Givens et al. 1993).

Les études épidémiologiques apportent des arguments substantiels associant les infections virales prénatales à un risque accru de développement de troubles neurologiques divers, comme la paralysie cérébrale, ou neuropsychiatriques, comme la schizophrénie et les syndromes autistiques. Cependant, même si ces infections virales semblent participer à l'étiologie de ces maladies, aucun véritable lien causal n'a pu être mis en évidence.

Depuis les années 2000, les modèles animaux d'infection virale congénitale se sont considérablement développés et constituent une approche propice à la compréhension des mécanismes physiopathologiques impliqués dans l'altération du fonctionnement du SNC à court ou à long terme. L'étude de modèles d'infection *in vivo*, en particulier chez le rongeur a notamment permis de caractériser les effets d'une infection systémique prénatale sur le développement cérébral et le comportement ultérieur de la progéniture. La plupart des modèles étudient les effets d'une infection virale systémique au cours de la gestation et ont principalement été réalisés chez le rat et la souris.

L'activation immunitaire maternelle (AIM) représente un des phénomènes permettant d'établir un lien entre infection virale maternelle et développement de pathologies du SNC chez le foetus. Ce phénomène d'AIM a notamment été mis en évidence dans les modèles mimant une infection virale par injection de Poly I:C (acide polyriboinosinic-Polyribocytidylic), ARN double brin synthétique structuralement semblable à l'ARN bicaténaire de certains virus ; ou encore mimant une infection bactérienne par injection de LPS (Lipopolysaccharide), endotoxine de la membrane externe des bactéries à Gram négatif. Les Poly I:C sont des agonistes des récepteurs intracellulaires TLR-3 exprimés au niveau des endosomes des cellules immunes (microglie, macrophages) et non immunes (neurones, astrocytes) du SNC et sont impliqués dans la reconnaissance des ARN double brins, produits de la réplication virales.

Les mécanismes responsables des effets pathologiques médiés par l'infection maternelle sur le développement cérébral *in utero* restent mal compris. La **Figure 5** récapitule différents

élément cellulaire, moléculaires et métaboliques potentiellement induits par une infection, qu'elle soit virale ou bactérienne, survenant au cours de la vie prénatale.

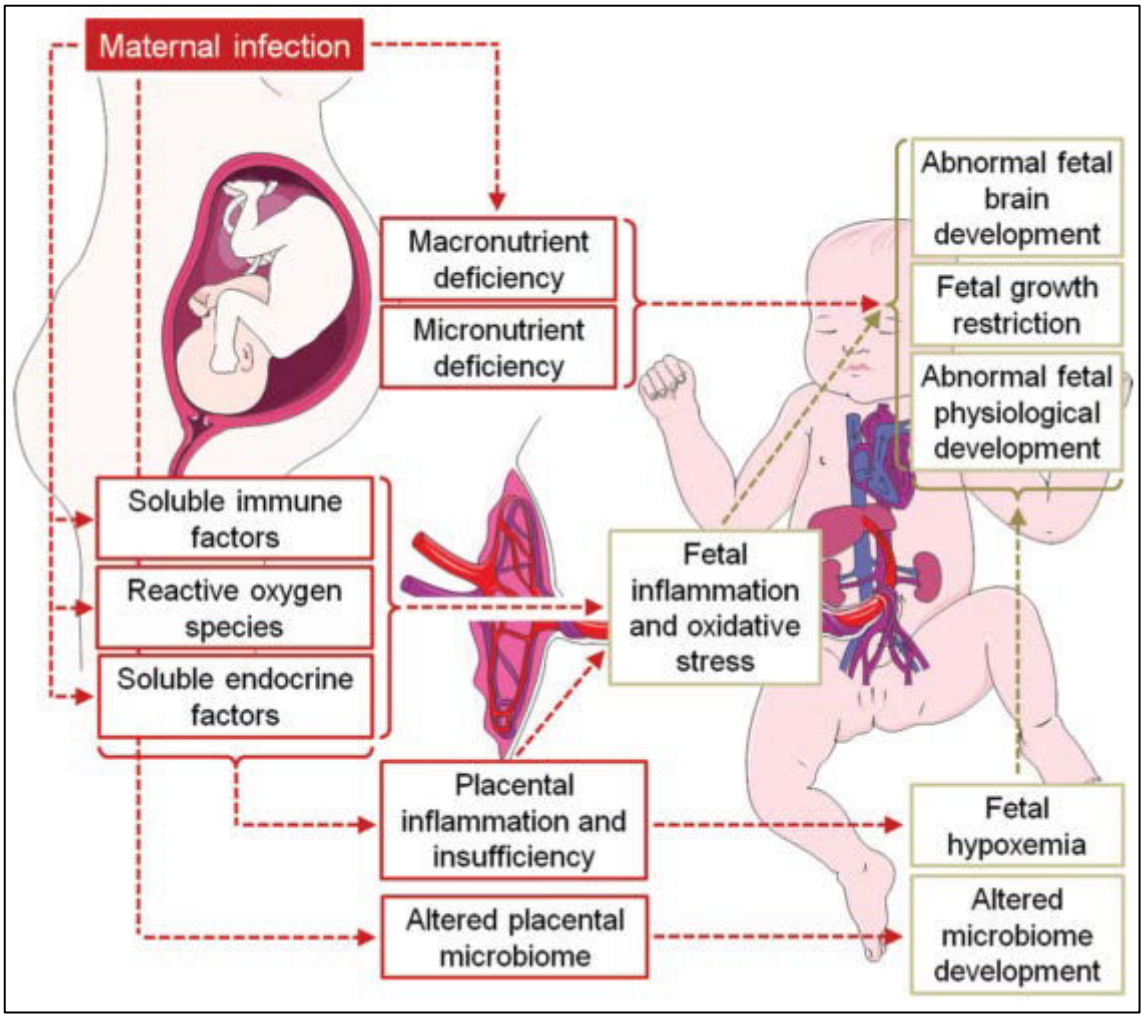


Figure 5. Mécanismes potentiels responsables des effets pathogènes d'une infection maternelle sur le développement fœtal. (D'après Labouesse et al., 2015)

Bien évidemment, l'ensemble de ces éléments ne sont pas exclusifs et leur interaction conditionne l'altération des processus développementaux capables d'affecter l'architecture cérébrale et son fonctionnement post-natal.

En particulier, l'augmentation de certaines cytokines pro-inflammatoires (IL-6, IL-1beta) dans le sang maternel, la sécrétion de glucocorticoïdes, le stress oxydatif, ou encore l'insuffisance placentaire, sont susceptibles d'altérer le développement et le fonctionnement du cerveau immature. Des études ont notamment montré que le blocage des IL-1 et IL-6 dans la circulation sanguine maternelle était capable de prévenir la survenue de troubles du SNC causés par une exposition au LPS et aux Poly I:C (Smith et al, 2008), (Paintlia et al. 2008).

Certains événements survenant *in utero* à la suite d'une infection maternelle peuvent également modifier le fonctionnement des réseaux neuronaux à long terme et être responsables de troubles comportementaux pouvant survenir plus tardivement dans la vie de l'individu. Différents arguments peuvent expliquer ce phénomène : **(1)** L'infection prénatale pourrait par exemple altérer l'expression de certaines protéines comme des facteurs trophiques ou des neuromédiateurs, à une période critique de la mise en place des réseaux neuronaux, entrainant la formation de circuits aberrants. **(2)** Ces infections prénatales pourraient également causer des modifications épigénétiques (comme la méthylation des histones) conduisant à des changements à long terme dans l'expression de certains gènes pouvant ainsi impacter la structure ou la fonction de réseaux neuronaux spécifiques (Van Opdenbosch et al. 2012). **(3)** Enfin, les infections prénatales peuvent aussi induire une dérégulation du système immunitaire périphérique pouvant avoir un impact sur le fonctionnement cérébral à long terme. L'exposition prénatale au LPS chez le rat a été associée à des taux plasmatiques augmentés d'IL-6 chez les animaux adultes. (Borrell et al. 2002). De nombreux travaux établissent un lien entre la présence de cytokines pro-inflammatoires et l'altération du fonctionnement du SNC (Lucas et al. 2006).

Conclusion du chapitre I

Les infections virales du SNC peuvent conduire au développement de pathologies neurologiques. De nombreux facteurs comme le statut immunitaire et l'âge de l'hôte, l'intégrité de la BHE, la charge et le tropisme viral, vont influencer l'apparition et l'évolution de la maladie. De plus, il n'existe pas vraiment de prototype viral capable de se disséminer au sein du SNC et les nombreux travaux sur le sujet suggèrent que quasiment tous les types de virus peuvent envahir le SNC si les conditions propices sont réunies (Van den Pol 2006).

Les virus qui infectent le SNC peuvent causer des symptômes neurologiques et des séquelles à long terme. En outre, la simple présence du virus, notamment à un moment clé du développement cérébral, peut laisser une empreinte délétère dans le cerveau, et être à l'origine de pathologies se déclenchant tardivement dans la vie d'un individu. Selon la région cérébrale infectée un même virus peut induire une grande variété de troubles neurologiques.

A l'inverse, différents virus peuvent aussi avoir une seule et même cible au niveau du SNC, et causer la même maladie.

L'accès des virus au SNC se faisant le plus souvent par voie hématogène, l'activation initiale du SI périphérique peut également avoir un impact sur le fonctionnement du SNC. Au sein du SNC, l'infection de cellules non neuronales peut également causer la libération de médiateurs inflammatoires pouvant altérer la mise en place et/ou le fonctionnement des réseaux neuronaux.

Etant donné les nombreux acteurs et les nombreuses étapes qui entrent en jeu au cours d'une infection virale du SNC, l'étude des modèles animaux est évidemment cruciale pour essayer de comprendre certains des processus physiopathologiques conduisant à l'émergence de pathologies neurologiques.

Ainsi, après avoir décrit de manière générale la problématique des infections virales du SNC, nous aborderons plus précisément, dans le prochain chapitre, le cas de l'infection congénitale cérébrale par le CMV, pathologie dont les mécanismes restent encore mal connus et qui représentent une cause majeure d'atteinte neurologique et sensorielle.

II) Les infections congénitales à cytomégalovirus

1. Aspects épidémiologiques et cliniques

a. Epidémiologie

L'infection congénitale par le cytomégalovirus (CMV) constitue la première cause d'infection virale au cours de la grossesse. Elle correspond également à la première cause de surdité non génétique d'une part et de retard psychomoteur d'autre part. Ces infections congénitales constituent un véritable problème de santé publique de par leur incidence, estimée entre 1 et 5% des naissances (Manicklal et al. 2013) et par l'enjeu économique qu'elles représentent, avec un coût annuel estimé à plus de 1,86 Milliard de dollars aux Etats-Unis (Nassetta et al. 2009). En France, on considère que 50% des femmes enceintes sont séronégatives et 0.5% d'entre elles auront une primo-infection à CMV au cours de leur grossesse. Après primo-infection maternelle, la transmission verticale du virus a lieu dans environ 40% des cas (Cheeran et al. 2009) **(Figure 6)**. Entre 5 et 10% des enfants infectés au cours de la grossesse développent une forme symptomatique (Bonalumi et al. 2011), (Elizabeth C. Swanson, DO and Mark R. Schleiss 2013) à la naissance, caractérisée par un retard de croissance, une polymicrogyrie, un ictère, une hépatosplénomégalie ou encore une thrombocytopénie néonatale. Parmi ces enfants présentant une infection symptomatique, certains développent une forme sévère responsable de décès néonataux et d'autres développent des lésions cérébrales consécutives à une microcéphalie, à la présence de calcifications intracrâniennes ou d'une dilation ventriculaire. Ces lésions sont responsables d'un handicap neurologique parfois lourd et des séquelles neurosensorielles comme une atteinte visuelle, auditive ou vestibulaire. Environ 10% des enfants asymptomatiques à la naissance développent, malgré l'absence de signes cliniques néonataux, des séquelles neurologiques comme un retard mental, ou des crises d'épilepsie, et sensorielle comme la surdité. Dans 80 à 85% des cas les enfants infectés *in utero* restent asymptomatiques et les conséquences à long terme de ces infections ne sont pas vraiment connues.

Certains travaux établissent un lien entre ces infections congénitales et l'apparition de maladies neuropsychiatriques telle que la schizophrénie (Hoffmann et al. 2010) ou des troubles du spectre autistique (Yamashita et al. 2003), (Sakamoto et al. 2014).

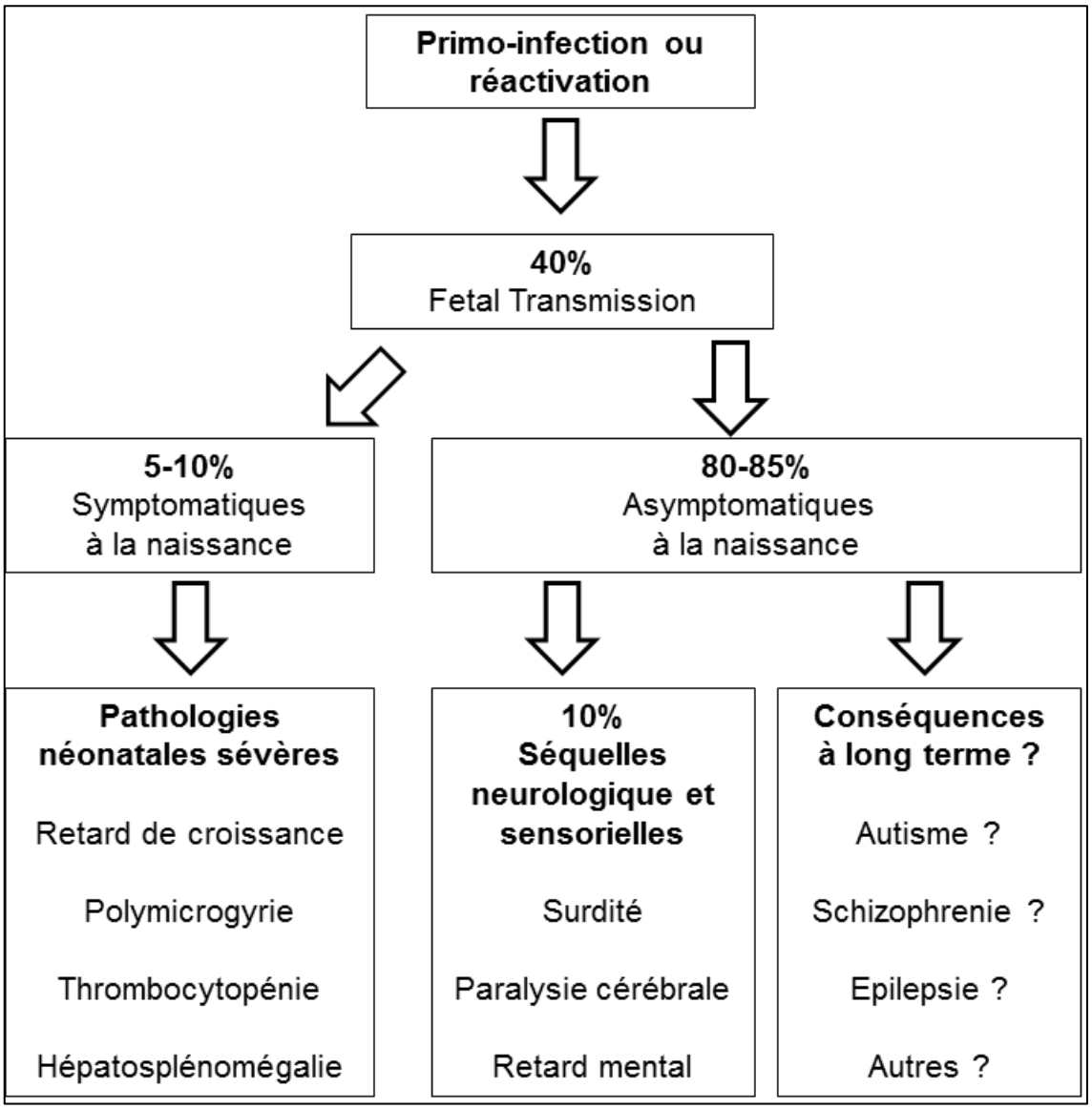


Figure 6. Représentation schématique de la transmission verticale du CMV et ses conséquences pathologiques.

b. Caractéristiques cliniques

Parmi les manifestations cliniques associées à l'infection congénitale à CMV, les plus sévères sont celles touchant le SNC. Contrairement aux pathologies affectant le système réticuloendothélial (anémie, hépatosplénomégalie) qui sont en général transitoires, les déficits neurologiques constatés à la naissance sont souvent irréversibles.

i. Anomalies prénatales

En cas d'infection symptomatique constatée au cours de la période intra-utérine, les examens d'imagerie telle que l'échographie fœtale par voie transvaginale et dans certains cas l'imagerie par résonance magnétique (IRM) révèlent la présence d'anomalies cérébrales morphologiquement identifiables dès la vingtième semaine de gestation (Malinger et al. 2003), (Simonazzi et al. 2010) **(Figure 7)**. Parmi ces anomalies cérébrales, les plus communes associées à l'infection congénitale à CMV sont : les dilatations ventriculaires, l'atrophie cérébrale (perte en volume), la gliose de la substance blanche, les kystes parenchymateux, la présence de calcifications periventriculaires ainsi que diverses malformations corticales, dont la polymicrogyrie est la plus représentée (Barkovich & Girard 2003).

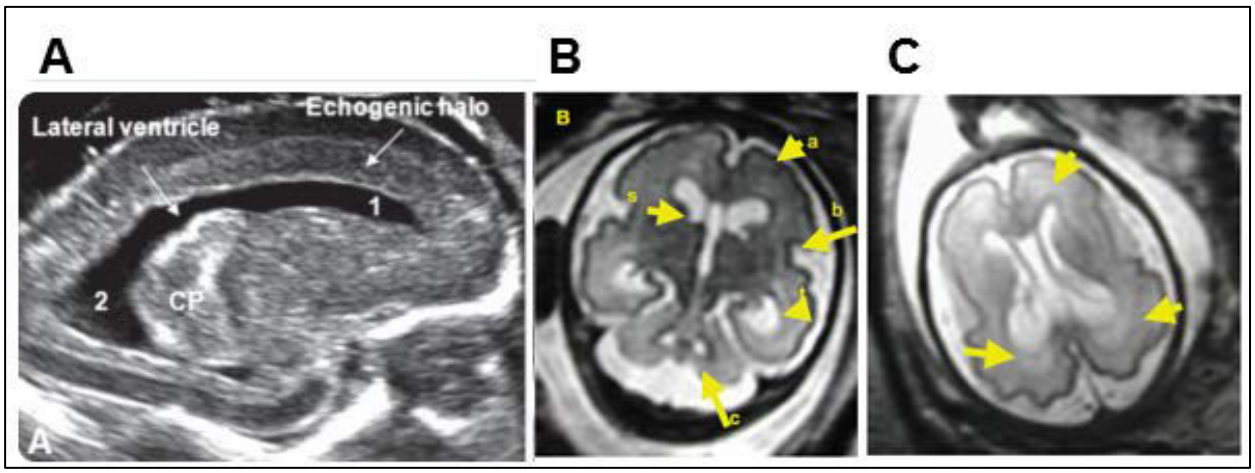


Figure 7. Examens d'imagerie de fœtus infectés par le CMV.

A.Echographie trans-vaginale d'un cerveau fœtal à 20.5 semaines de gestation. ((Simonazzi et al. 2010)**.** Plan parasagittal montrant le ventricule latéral (flèche) et la présence d'un signal échogène (flèche).
1 : Corne frontale, 2 : Corne occipitale, CP Choroïde plexus. **B.** IRM en pondération T2 montrant la présence d'une ventriculomégalie et d'un hypersignal de la substance blanche. **C**. IRM coronal en pondération T2 montrant une anomalie de la gyration corticale (a), l'aspect en carré de la scissure de Sylvius (b), un hypersignal de la substance blanche temporale (t) la présence de kyste subépendymaires (s) et un signal anormal du cervelet. (Olivier Picone1*, Isabelle Simon2, Alexandra Benachi1 2008).

ii. Anomalies postnatales

En période post-natale, les stigmates d'une infection *in utero* par le CMV sont également retrouvés au travers des examens de tomodensitométrie (TDM) et d'IRM. **(Figure 8).** Les calcifications intracrâniennes étant les plus fréquentes devant la ventriculomégalie, les anomalies de substance blanche et les malformations corticales (polymicrogyrie, lissencéphalie, schizencéphalie), ces dernières étant souvent prédictives d'un pronostic plutôt sombre. Cependant, toutes ces anomalies sont extrêmement variables d'un individu à l'autre et particulièrement difficiles à évaluer sur le plan clinique chez le nourrisson (Manara et al. 2011).

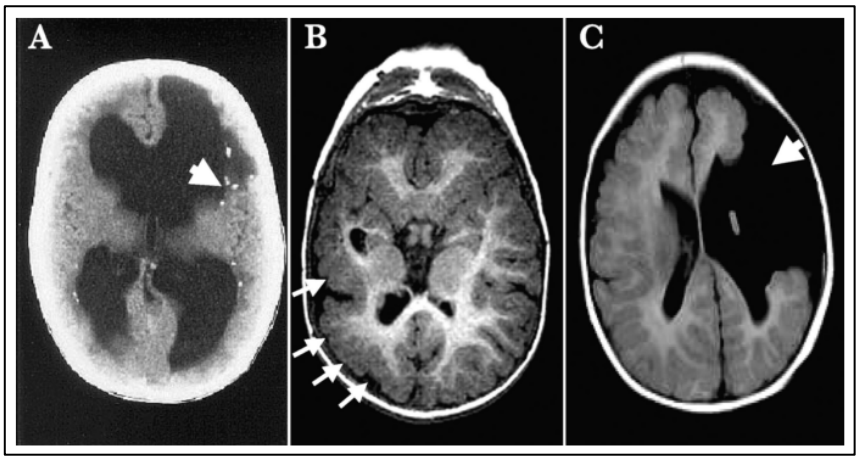


Figure 8. Imagerie cérébrale de trois enfants symptomatiques pour une infection congénitale à CMV. (D'après Maxim C-J Cheeran, Lokensgard, & Schleiss, 2009)

A : Examen de tomographie montrant la présence de calcifications periventriculaires (Flèche). B : Imagerie par Résonnance Magnétique (IRM) révélant une polymicrogyrie, caractérisée par un défaut de la gyration corticale (flèches). **C** : IRM mettant en évidence une anomalie morphologique sévère due à la présence de kyste porencéphaliques associés à une schizencéphalie (flèche).

c. Pathologies neurologiques et sensorielles liées aux infections congénitales à CMV.

Les infections congénitales à CMV, qu'elles soient symptomatiques sont une cause majeure de troubles neurologiques et sensoriels irréversibles. Microcéphalie, Polymicrogyrie, épilepsie, paralysie cérébrale (PC), surdité, et déficience visuelle sont le plus souvent répertoriés comme séquelles graves de l'infection congénitale à CMV.

i. La Microcéphalie

La microcéphalie est un trouble neurodévelopemental caractérisé par un diamètre de la boite crânienne inférieur à la normale. Elle est définie par une circonférence moyenne de la tête inférieure au 5^{e} rang percentile pour l'âge gestationnel ou post-natal considéré (Ahlfors et al. 1986). La microcéphalie affecte environ la moitié de tous les patients survivant à l'infection (Boppana et al. 2013). De plus, elle est considérée comme étant un facteur prédictif spécifique de l'apparition d'un retard mental chez les enfants atteints.

ii. La Polymicrogyrie

La polymicrogyrie (PMG) est l'anomalie du développement cortical la plus fréquente caractérisée par un cortex plus épais et la présence de multiples circonvolutions. Cette pathologie est considérée comme pouvant résulter d'une altération de l'organisation corticale affectant les couches profondes du cortex.(Barkovich 2010).

Les patients atteints présentent des manifestations cliniques très variées incluant des hémi ou des quadriparésies, et des crises épileptiques partielles. Les déficits neurologiques observés sont souvent en lien avec la portion de cortex touché, atteinte pouvant être focale, multifocale ou diffuse. Les régions périsylviennes des deux hémisphères cérébraux sont le plus souvent concernées et on parle alors de PMG Bilatérale périsylvienne. Parmi les étiologies possibles, les infections congénitales par le CMV représentent une cause fréquente de PMG. (White et al. 2014). En particulier, les infections à CMV survenant entre la 18ème et la 24ème semaine de gestation seraient associées à la présence de PMG (Barkovich & Lindan n.d.). Cependant, les processus physiopathologiques mis en jeu par le virus et conduisant au développement de cette pathologie ne sont pas connus.

iii. L'épilepsie

Il existe étonnamment peu de données démontrant de manière certaine un lien entre les infections congénitales à CMV et le développement de crises d'épilepsie. En effet, dans la plupart des travaux, les auteurs emploient le mot « crise » sans poser un diagnostic clair d'épilepsie. Une étude rétrospective réalisée en 1990 par Bale et al a pu mette en évidence la survenue de crises tonic-cloniques, de crises focales et de spasmes musculaires chez des nourrissons présentant les symptômes d'une infection congénitale à CMV ; la présence de spasmes infantiles chez ces enfants ayant également été attribuée à un syndrome de West. Ce syndrome est une forme rare d'épilepsie du nourrisson caractérisée par la survenue de séries de contractions musculaires involontaires. Une étude sur 10 ans suggère l'implication des infections congénitale à CMV dans ce syndrome, un traitement antiviral précoce (ganciclovir) couplé à des anti-épileptiques permettant de stopper la survenue des crises spasmodiques (Stern 1976). Par ailleurs, une étude réalisée en 2008 par Suzuki et al ((Suzuki et al. 2008) suggère que les individus infectés *in utero* par le virus semblent plus enclins à développer des crises d'épilepsie au cours de la petite enfance.

Bien qu'aucune étude ne fasse état de l'association entre infection congénitale à CMV et convulsions *in utero* (Usta et al. 2007) révélatrices de crises d'épilepsie fœtales, ces infections survenant au cours de la grossesse pourraient tout à fait être responsables de la survenue de ces crises chez le fœtus.

iv. La Paralysie cérébrale

La paralysie cérébrale (PC) représente la cause la plus fréquente de déficit moteur chez l'enfant. Il s'agit d'un syndrome complexe essentiellement caractérisé par une altération de la posture et du mouvement très souvent associés à des déficits sensoriels ainsi qu'à des troubles cognitifs et comportementaux. Sur le plan moteur, on distingue trois formes de PC : spastique, dyskinétique, et ataxique. L'altération de la substance blanche, notamment au niveau du tractus cortico-spinal, est largement suspectée dans l'apparition et la sévérité des symptômes moteurs (Scheck et al. 2012). L'atteinte précoce du cerveau au cours du développement fœtal semble être un facteur étiologique de premier plan (Hankins & Speer 2003). En effet, de nombreux événements pouvant survenir au cours développement du SNC, notamment *in utero* ont été associés avec la présence d'une PC, comme les anomalies placentaires, le retard de croissance intra-utérin (RCIU), la pré-éclampsie, l'hypoxie périnatale et les infections maternelles. De manière intéressante, toutes ces manifestations cliniques peuvent résulter d'une infection congénitale à CMV (Cheeran et al. 2009a)(Higgins et al. 2010) (Walter-Nicolet et al. 2011). La PC est en effet fréquemment retrouvée chez les enfants diagnostiqués symptomatiques au CMV. (Engman et al. 2010). Une étude récente menée par Dakovic et al confirme également la présence d'une PC sévère majoritairement spastique bilatérale, chez des enfants symptomatiques pour une infection congénitale à CMV (Dakovic et al. 2014).

v. Les troubles de l'audition

La surdité représente le type de déficit neurosensoriel le plus fréquemment observé dans le cadre des infections congénitales à CMV. (Goderis et al. 2014). Dans ce contexte, la surdité peut présenter différents profils évolutifs. Elle peut en effet avoir une pléthore de degrés de sévérité, être d'emblée profonde, évolutive ou encore fluctuante. Elle peut également être de révélation tardive. On considère qu'elle apparait en moyenne à 33 mois en cas d'infection symptomatique à la naissance et 44 mois en cas de forme asymptomatique et s'aggrave dans 50% des cas (Fowler & Boppana 2006). Certain de ces enfants seront candidats à une implantation cochléaire afin de réhabiliter l'audition.

Les mécanismes physiopathologiques responsables de cette surdité ne sont pas complétement élucidés. De nombreux arguments plaident pour la persistance du CMV dans l'oreille interne. En

effet, la présence d'ADN viral a été retrouvée dans le liquide périlymphatique de patients sourds profonds à la suite d'une infection congénitale à CMV. Les études histologiques des rochers d'enfants aux antécédents d'infection congénitale ont authentifiés la présence de cellules à inclusions cytomégaliques au sein de la strie vasculaire, de la membrane de Reissner et au niveau des cellules de soutien de l'organe de Corti. La survenue tardive de la surdité chez certains patients suggère un phénomène de persistance du virus et/ou un processus inflammatoire de l'oreille interne et/ou des voies auditives. Récemment, l'implication de mécanismes inflammatoires à l'origine de la destruction des neurones du ganglion spiral ont été proposé dans un modèle murin néonatal d'infection par le MCMV. (Bradford et al. 2015)

vi. Les troubles de la vision

L'atteinte visuelle n'est pas aussi fréquente que la surdité ou le retard de croissance. Cependant, les troubles visuels surviennent tout de même chez 10 à 20 % des enfants symptomatiques et chez 1% à 2% des enfants asymptomatiques. Les causes d'altération visuelle comprennent, la rétinite, le syndrome de vision aveugle d'origine corticale, (incapacité du cortex visuel à décoder l'information visuelle envoyé par la rétine) et l'atrophie du nerf optique. D'autres troubles visuels ont également été associés aux infections congénitales à CMV comme le strabisme ou encore un développement incomplet de l'œil (Coats et al. 2000).

d. Transmission du virus

La transmission de l'infection par le CMV peut survenir tout au long de la vie d'un individu. Chez les personnes immunocompétentes, les infections à CMV sont majoritairement asymptomatiques. Chez certains individus, la primo infection induira un simple syndrome mononucléosique responsable d'un état fébrile temporaire. En cas d'immunodéficience, les conséquences de ces infections peuvent être particulièrement dramatiques.(Maxim C-J Cheeran, Lokensgard, & Schleiss, 2009). Classiquement, la transmission du CMV nécessite un contact direct, le plus souvent par voie aéro-pharyngée, sexuelle et sanguine (transfusion, greffes).
La présence de virus dans la salive, les sécrétions cervico-vaginales et séminales rend le vecteur de transmission incertain, mais la salive à elle seule serait suffisante pour transmettre l'infection.
La transmission horizontale du virus est fréquente dans les crèches en raison du nombre et de la promiscuité des enfants et joue un rôle majeur dans l'épidémiologie de nombreuses infections à CMV en particulier celles touchant les jeunes mères.

La transmission verticale, se fait par voie hématogène à l'interface placentaire séparant la circulation fœtale de la circulation maternelle. Le placenta constituant une barrière qui s'oppose au passage des cellules et des macromolécules, il est admis que des virions libres, n'ayant pas infecté une cellule au préalable, puissent directement être transmis au fœtus. Cependant, la voie exacte de passage du virus à travers le placenta n'est pas clairement définie ((Fisher et al. 2000); (Hemmings et al. 1998). De plus, certain travaux suggèrent que les cellules placentaires constitueraient une source de réplication primaire et servirait ainsi de réservoir d'amplification au CMV pour assurer sa dissémination dans la circulation fœtale (Griffith et al. 1985). Une fois dans le fœtus, le virus infecte généralement le foie puis se répand vers les autres organes. Les mécanismes qui sous-tendent la stratégie de dissémination du CMV et le tropisme du virus pour tel ou tel organe, en particulier pour le cerveau fœtal, ne sont pas connus. Le CMV peut également être transmis en période périnatale, par contact avec les sécrétions cervico-vaginales au moment de l'accouchement, ou plus souvent par le lait maternel. En effet, plus de 50% des enfants nourris au sein d'une mère infectée, deviennent séropositifs au CMV.

e. Diagnostic et prise en charge thérapeutique

i. Diagnostic des infections congénitales

L'aspect quasi exclusivement « silencieux » de ces infections chez l'adulte sain, rend leur diagnostic chez la femme enceinte difficile. De plus, l'absence de mesures thérapeutiques validées s'oppose à une surveillance systématique de la sérologie au cours de la grossesse. Les femmes enceintes infectées par le virus peuvent être dépistées par la présence d'une séroconversion IgG-positive, par mesure de l'avidité aux IgG, ou par la présence d'IgM, qui reste détectables dans le sang pendant plus de 6 mois après la primo-infection.

L'infection fœtale ou celle du nouveau-né peut être diagnostiquée sur la base de données biologique et d'imagerie. Chez le fœtus, la détection repose principalement sur une PCR (*Polymerase Chain Reaction*), à partir du liquide amniotique.

Chez les nouveau-nés, le diagnostic repose sur la détection du virus dans les fluides corporels (salive et urine majoritairement) par PCR, culture cellulaire et immuno-marquage, notamment de la protéine pp65 entrant dans la composition de la capside virale.

Ce dépistage est généralement réalisé durant les 3 premières semaines de vie (Prateek et al. 2010) car la distinction entre infection congénitale et infection post-natale devient difficile à après cette période. L'imagerie, quant à elle, va permettre de confirmer le diagnostic biologique et de préciser la localisation de l'infection.

Dans le cas d'une infection cérébrale, les examens de neuroimagerie utilisés sont l'échographie, l'IRM et le scanner. Comme nous avons pu le voir précédemment, certains signes, comme la ventriculomégalie ou la présence de calcifications periventriculaires sont évocateurs d'une infection congénitale à CMV. Ces signes peuvent, combinés aux examens biologiques mais également aux manifestations cliniques présentes chez le nouveau-né, permettre de poser un diagnostic précis.

ii. Prise en charge thérapeutique

Le traitement des infections congénitales à CMV, notamment par administration d'antiviraux spécifiques, doit être instauré chez les enfants présentant des signes évidents d'atteinte du SNC, des troubles sensori-moteurs ou une infection sévère des organes périphériques (hépatite, pneumonie). La pierre angulaire du traitement antiviral est le ganciclovir (GCV), analogue nucléosidique qui agit en bloquant la réplication de l'ADN viral. Le GCV et sa prodrogue, le Valganciclovir (VGCV) (administré *per os*) peuvent être administrés chez le nouveau-né et sont particulièrement bien tolérés. Ces antiviraux sont principalement utilisés dans la prise en charge des pathologies sévères touchant notamment les organes périphériques. Dans le cadre des infections touchant le SNC, des essais cliniques randomisés ont montré un bénéfice à long terme du traitement par le ganciclovir, avec en particulier, une amélioration clinique des déficits auditifs chez les nouveau-nés symptomatiques. (Diego et al. 2003). Une étude ultérieure a également reporté les effets favorables à long-terme de l'administration de GCV sur le développement cérébral, notamment sur le plan cognitif et comportemental comparé aux enfants non traités. Au regard des résultats de ces études, les instances sanitaires préconisent un traitement au GCV de 6 semaines par voie intraveineuse, chez les enfants symptomatiques pour infection congénitale à CMV impliquant des troubles du SNC. Le VGCV est quant à lui donné par voie orale et représente donc une alternative à l'administration parentérale. Bien que le VGCV soit particulièrement bien toléré (Müller et al. 2008) un manque de recul sur les effets de cette pro-drogue sur le long court ne permet pas de recommander un traitement de longue durée (6 mois) chez les enfants symptomatiques.

D'autres antiviraux sont disponibles, comme le Foscarnet et le cidofovir mais encore une fois, il existe très peu d'informations sur l'efficacité de ces traitements sur le long terme et leur utilisation reste limitée à des circonstances exceptionnelles, par exemple en cas de résistance du CMV au GCV (Erice 1999) ou chez les enfants immunodéprimés atteints de pathologies sévères touchant les organes périphériques (Marshall & Koch 2009).

Même si ces antiviraux constituent un traitement efficace pour les nouveau-né et les enfants en bas-âge, l'utilisation des tous ces antiviraux est proscrite au cours de la grossesse et pendant l'allaitement. En effet, des études pré-cliniques ont démontré une létalité embryonnaire, une fœto-toxicité ainsi que des effets tératogènes chez des animaux traités au GCV pendant la gestation. En raison d'un manque de connaissance chez l'humain, seule la balance bénéfice/risque peut permettre de valider l'utilisation de ce traitement chez la femme enceinte (Crumpacker CS et al, 1992 ; Safrin S et al, 1997)

Les molécules de la famille des flavonoïdes, métabolites secondaires des plantes largement répandus dans le règne végétal, sont des candidats prometteurs de par leur faible toxicité et leurs capacités antivirales. Quatre flavonoïdes, en particulier, la baicaleine et la quercetine, ont démontré leur efficacité *in vitro* dans l'inhibition de la réplication du HCMV, en agissant au niveau des étapes précoces du cycle viral et notamment en bloquant l'activité de l'ADN polymérase. De plus la combinaison de baicaleine et de quercetine induit un effet de synergie sur l'activité antivirale. (Cotin et al. 2012)

iii. Prévention de l'infection congénitale : Immunisation active et passive

Le développement d'un vaccin contre le CMV constituerait en théorie la stratégie la plus prometteuse pour lutter contre le problème des infections congénitales. En effet, l'action préventive de la vaccination permettrait d'éviter la survenue de séquelles neurologiques et autres troubles chez le nouveau-né. De nombreux vaccins potentiels ont été évalués dans de multiples essais cliniques.

Immunisation à partir de virus atténués

Notamment, l'utilisation de la souche Towne atténuée a été évaluée, en particulier chez les sujets immunodéficients, et dans le cadre des transplantations d'organes à risques de contamination par le CMV (Plotkin et al. 1984).

Bien que ce vaccin soit capable d'établir une réponse immunitaire cellulaire et humorale et démontrent un effet sur l'infection par le CMV, le potentiel vaccinal a été remis en question dans une étude ultérieure ne montrant aucun bénéfice de la vaccination chez les femmes enceintes (Nyholm & Schleiss 2010).

Immunisation à partir de molécules dérivées du virion

En parallèle des virus atténués, d'autres stratégies de vaccination utilisant des protéines virales purifiées ou de l'ADN viral ont également été développées et sont en cours d'essais cliniques. Ces vaccins ciblent les protéines de l'enveloppe et de la capside qui jouent un rôle clé dans la réponse immunitaire cellulaire et humorale mise en jeu spécifiquement contre le CMV. En particulier, un vaccin, le gB/MF59 basé sur la glycoprotéine gB de l'enveloppe a récemment passé la phase II des études cliniques et a démontré une efficacité d'immunisation de 50% chez des jeunes femmes saines en *post-partum*, avec la présence d'une infection symptomatique chez les nouveau-nés dans seulement 1% des cas contre 3% dans la groupe placebo (Rieder & Steininger 2013)

Les immunoglobulines

En plus des stratégies d'immunisation active, l'immunisation passive basée sur l'administration d'immunoglobulines (Ig) aux femmes présentant un risque de transmettre le virus au fœtus, représente un autre versant de la recherche clinique. Plus spécifiquement, les hyperimmunoglobulines (HIG) constituent une approche thérapeutique potentiellement prometteuse dans le cadre des infections congénitales à CMV. Les mécanismes d'action des HIG sont complexes et ne sont pas complétement élucidés mais passeraient par une activité antivirale couplée à un effet immunomodulateur, notamment par l'inhibition de la synthèse de cytokines cellulaires (Fouts et al. 2012). Les modèles animaux, notamment chez le cochon d'inde, ont démontré l'efficacité du traitement en améliorant la survie des animaux et en réduisant les conséquences neuroinflammatoires de l'infection congénitale (Bratcher et al. 1995), (Chatterjee et al. 2001). L'administration par voie intraveineuse d'hyperimmunoglobulines (HIG) chez des femmes enceintes séropositives au CMV et pour lesquelles de l'ADN viral a été détecté dans le liquide amniotique a démontré une efficacité thérapeutique chez les nouveau-nés. (Nigro et al. 2005). Au-delà de la réduction du nombre de nourrisson symptomatiques, ce traitement diminue également de manière significative les anomalies placentaires et les malformations cérébrales (La Torre et al. 2006), (Nigro et al. 2008).

Une autre étude rétrospective a aussi fait part d'une réduction de la transmission materno-fœtale du virus à l'issue du traitement par HIG. (Buxmann et al. 2012). De plus, cette immunisation passive améliorerait le pronostic neurodévelopemental la première année après la naissance. (Visentin et al. 2012).

Néanmoins, une étude randomisée récemment publiée n'a pas montré de différences significatives chez les nourrissons issus de mères traitées par les HIG comparé au placebo, concernant le taux de transmission du virus et les conséquences biologiques et cliniques. (Nigro et al. 2015). De plus l'efficacité du traitement par HIG sur les déficits neurologique ou cognitifs à long-terme n'a pas été explorée. Les limites de cette thérapie reposent aussi sur le manque de connaissance concernant la toxicité fœtale et maternelle de ces HIG et posent le problème de la systématisation de leur utilisation. Le manque de recul actuel plaide en faveur d'une utilisation ciblée de ces HIG, dans les cas où les données échographiques et biologiques convergent. L'administration d'HIG pourrait par exemple être préconisée lorsque l'avidité des IgG maternelle pour le CMV est supérieure à 50%.

Quoi qu'il en soit, l'ensemble de ces études, si elles ne sont pas toutes concluantes, mettent l'accent sur le succès possible de thérapies immuno-modulatrices précoces dans l'atténuation des conséquences neurodéveloppementales des infections congénitales par le CMV.

iv. Prophylaxie

Le seul moyen aujourd'hui disponible pour véritablement prévenir l'infection maternelle est de limiter l'exposition des femmes enceintes au virus. Des efforts ont été entrepris pour réduire cette exposition, notamment grâce à l'établissement de mesures d'hygiène. En particulier, le lavage systématique des mains après contact avec un enfant en bas-âge, fait partie intégrante des recommandations mises en place par le CDC (Center of Diseases Control).

2. Caractéristiques virologiques du CMV humain

a. Historique

C'est en 1956 que le cytomégalovirus humain (HCMV) a été initialement isolé à partir des glandes salivaires. Cette particularité cellulaire lui donna le nom de Virus des glandes salivaires. Dans les années 60, Weller et al décidèrent de le renommer en cytomegalovirus en raison de la cytomégalie qu'il entraine chez les cellules infectées. Ce gigantisme cellulaire est notamment provoqué par la présence d'inclusions intra-nucléaires et intra-cytoplasmiques.

b. Taxonomie

Le CMV est un membre de la famille des *Herpesviridae* (Herpes virus : HHV : pour Human Herpes Virus) qui comprend en tout huit virus. Taxonomiquement, le CMV appartient à la sous-famille des bêta-herpesvirinae et il est désigné comme étant le cinquième du nom : le HHV-5. Il se caractérise par une spécificité d'hôte, un cycle de réplication lent et l'existence d'un phénomène de latence (Osborn, 1982; Ho, 1991; Mocarski, 1996).

c. Structure des virions

Comme les autres Herpesviridae, le HCMV est un virus à enveloppe et est composé d'un génome d'ADN double-brins linéaire. Il s'agit d'un virus de grande taille, dont le diamètre est compris entre 80 et 100 nm.

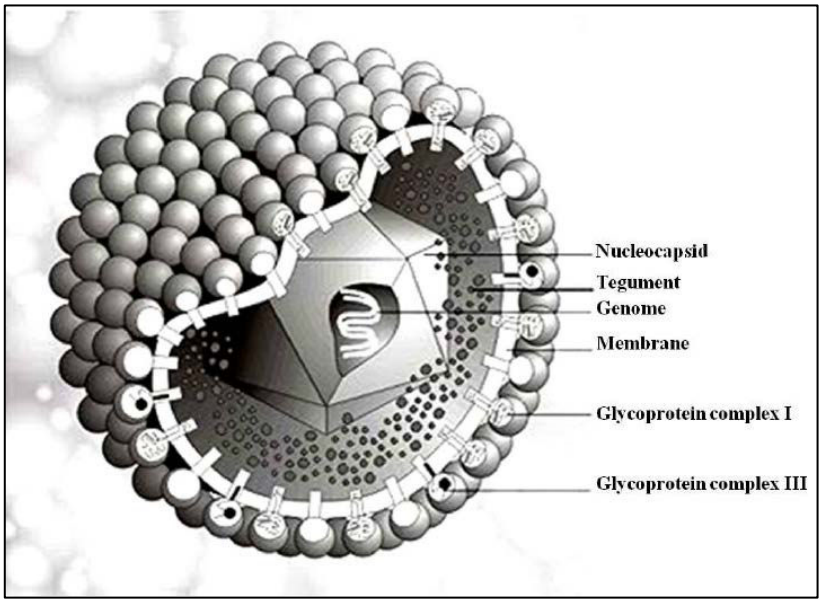


Figure 9. Structure d'un virion. (D'après : Tomtishen III, 2012)

Trois régions définissent la structure d'un virion : La capside, la couche de téguments et l'enveloppe **(Figure 9)**.

i. La capside

La capside est constituée de 162 sous-unités appelées capsomères, dont l'organisation symétrique de forme icosaédrique sert de loge au génome viral. Cette structure est facilement reconnaissable en microscopie électronique de par sa densité aux électrons.

ii. Les téguments

Autour de cette capside s'organise la couche de téguments particulièrement riche en protéines, notamment impliquées dans les interactions avec les récepteurs membranaires de la cellule et dans la réponse immunitaire adaptative à l'infection. (Bri & Revue 1991). C'est par exemple le cas de la phosphoprotéine pp65 qui participe majoritairement à la constitution du répertoire des lymphocytes T mémoires.(Kern et al. 2002)

iii. L'enveloppe

En périphérie des téguments se trouve l'enveloppe qui contient de nombreuses glycoprotéines virales, comme les complexe gB, gM/gN ou encore gH/gL/gO. En plus d'être des interlocutrices de la réponse immunitaire, (Navarro et al. 1997) (Rasmussen et al. 1991) ces glycoprotéines jouent également un rôle central dans les processus d'accrochage et d'entrée du virus dans ses cellules hôtes.(Ryckman et al. 2006).

d. Tropisme cellulaire au sein du SNC

Comme mentionné précédemment, le CMV est un virus spécifique d'espèce. Les expériences réalisées sur les modèles animaux et sur les cultures de cellules humaines ont permis de définir la susceptibilité des cellules du SNC pour le virus. Au cours des infections congénitales cérébrales, mais aussi celles affectant les individus immunodéprimés, le CMV infecte préférentiellement les cellules présentes au niveau des régions periventriculaires, notamment au sein des zones ventriculaire (VZ) et subventriculaire (SZV) (Teissier et al. 2014) (Cheeran et al. 2008). Ces zones forment la matrice germinale, également source de neurogenèse adulte, très riche en cellules souches neurales, précurseurs des astrocytes et des neurones.
In vitro, des études ont démontré que le CMV pouvait se répliquer efficacement dans les progéniteurs neuraux ((M. C. J. Cheeran et al. 2005) (Odeberg et al. 2006).

Comme nous le verrons ultérieurement, l'infection des cellules souches neurales au cours du développement *in utero* est une des pistes exploitées dans l'étude des mécanismes physiopathologiques, et permettrait en théorie d'expliquer les malformations cérébrales et les séquelles neurologiques observées chez les individus atteints ; nous verrons plus loin que c'est loin d'être la seule explication à envisager.

Les neurones matures, quant à eux, sont plutôt réfractaires à l'infection par le HCMV et sont retrouvés infectés en proportion plus faible (Teissier et al. 2014). Les études réalisées sur des cultures primaires neuronales ont révélé que la faible permissivité de ces cellules pour le HCMV serait le résultat de leur état de différentiation cellulaire trop avancé, empêchant la transcription des gènes viraux d'expression précoce et bloquant ainsi le cycle de réplication viral.
Cependant, le MCMV est capable de se répliquer dans les neurones *in vitro* et *in vivo* ((van Den Pol et al. 1999). De plus, la spécificité d'espèce devient relative *in vitro* : des cellules humaines peuvent être infectées par le MCMV, et le MCMV peut à son tour infecter des neurones de rat.

De nombreuses études *in vitro* ont permis de mettre en évidence le large tropisme du CMV pour d'autres types de cellules cérébrales **(Tableau 2).** Notamment, dans des cultures primaires humaines ou sur lignées cellulaires dérivées du cerveau, il a été montré que quasiment toutes les cellules cérébrales possédaient un degré de susceptibilité au HCMV. C'est donc le cas des cellules souches neurales et progéniteurs neuronaux (voir ci-dessus), mais aussi des astrocytes, des oligodendrocytes, des cellules microgliales et macrophages cérébraux... Cependant, *in vivo*, ces différents types cellulaires n'ont pas la même capacité à supporter un cycle complet de réplication viral (infection productive), cycle qui dépend de l'environnement transcriptionnel de la cellule hôte au moment de l'infection.

Les astrocytes, qui constituent environ 70% des cellules du cerveau, sont particulièrement susceptibles à l'infection par le HCMV. L'analyse de cerveaux fœtaux humains infectés autour de la 28ème semaine a permis de mettre en évidence que les astrocytes GFAP+ étaient une cible majeure du virus.(Teissier et al. 2014) **(Figure 10).**

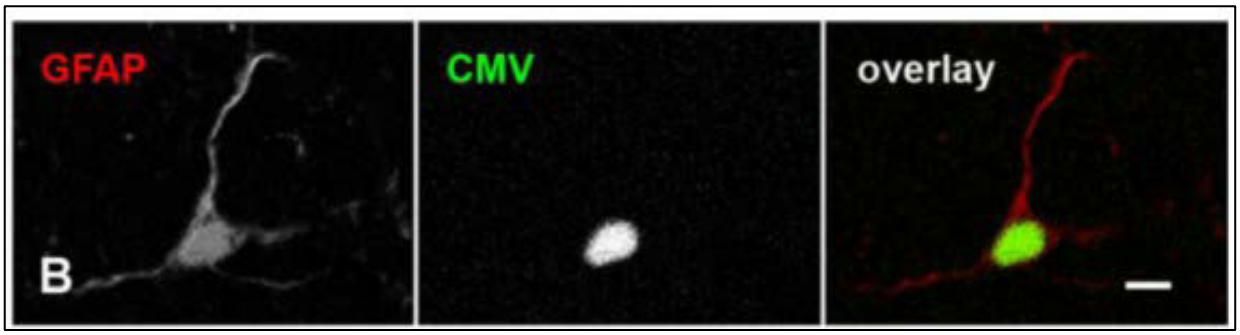


Figure 10. Immunohistochimie anti-GFAP et anti CMV montrant l'infection d'un astrocyte au niveau de la zone subventriculaire d'un cerveau fœtal humain. (Barre d'échelle : 10 µm) d'après (Teissier et al. 2014)

Concernant la permissivité des cellules microgliales à l'infection par le HCMV, les données sont contradictoires. Les travaux de Lokensgard et al (J Hum Virol, 1999) suggèrent un tropisme faible du virus pour la microglie. De plus, bien que la présence d'ADN viral ait pu être mise en évidence dans ces cellules, les protéines IE ne sont en revanche pas détectées (M. C.-J. Cheeran, Lokensgard, & Schleiss, 2009). Néanmoins, les cellules microgliales issues du prosencéphale d'embryons humains à 8 semaines de gestation, semblent être particulièrement susceptibles à l'infection (Lecointe et al. 1999). De surcroît, au sein de cerveaux fœtaux humains infectés *in utero*, le signal viral est retrouvé dans des cellules exprimant la protéine Iba1, marqueur spécifique des cellules microgliales et des macrophages (Teissier et al. 2014). L'étude réalisée par Schut et al (Schut et al. 1994) a aussi démontré que les cellules microgliales murines étaient fortement permissives à l'infection par le MCMV, en tout cas *in vitro* **(Figure 11).**



Figure 11. Immunohistochimie anti-Iba1 et anti-CMV montrant une cellule microgliale ou macrophage infecté dans le cerveau d'un fœtus humain. (Barre d'échelle : 10 µm).

Type cellulaire \ Approche	**in vitro**		**in vivo**	
Neurones matures	+/-	Lokensgard et al, 1999	++	Teissier et al, 2014
Précurseur neuronaux	+++	Odeberg et al, 2006	+++	Teissier et al, 2014
Cellules souches neurales	+++	Luo et al, 2010	+++	Teissier et al, 2014
Astrocytes	+++	Ho et al, 2007	+++	Teissier et al, 2014
Oligodendrocytes	+/-	Spiller OB et al, 1997	ND	ND
Microglie	+/-	Lokensgard et al, 2002 Lecointe et al, 2002	+/-	Teissier et al, 2014
Macrophages (dérivés de monocytes)	+++	Fish et al, 1996 ; Frascaroli et al, 2009	++	Teissier et al, 2014
Pericytes	+++	Alcendor et al, 2012	-	Teissier et al, 2014

Tableau 2. Permissivité des cellules cérébrale au HCMV.

+/- : peu fréquent ; ++ : fréquent ; +++ : Très fréquent ; ND : Non déterminé

Les cellules endothéliales de la BHE sont également sujettes à l'infection par le virus. Le HCMV induit dans ces cellules un cycle de réplication aboutissant à la lyse de la cellule infectée. Trois gènes viraux ont été identifiés comme étant critiques pour l'infection des cellules endothéliales : UL128, UL130 et UL131A (Ryckman et al. 2006). Ces gènes exprimés au cours du cycle de réplication virale, sont connus pour muter à l'issue des différents passages en culture cellulaire, pouvant notamment expliquer l'hétérogénéité de tropisme observé entre les différentes souches de CMV.

Plus récemment, Kawasaki et al ont mis en évidence *in vivo* le tropisme très précoce du MCMV pour des types cellulaires exprimant l'intégrine beta-1. Les résultats de cette étude établissent une relation entre la répartition initiale des particules virale et la localisation des cellules possédant un fort taux d'intégrine beta-1, en particulier au niveau des plexus choroïdes et des méninges.

e. Le cycle réplicatif du HCMV

Dans le cas d'une infection productive, le cycle du HCMV varie de 96 à 120 heures. L'infection est initiée par la fixation du virus sur la membrane cellulaire, la fusion des membranes virales et cellulaires ou l'endocytose du virion suivie de la fusion des membranes. Après libération de la capside, l'ADN viral est directement transloqué au noyau. Vient ensuite les étapes de transcription des gènes viraux et leur traduction en protéines virales qui vont constituer les futurs virions. **(Figure 12)**

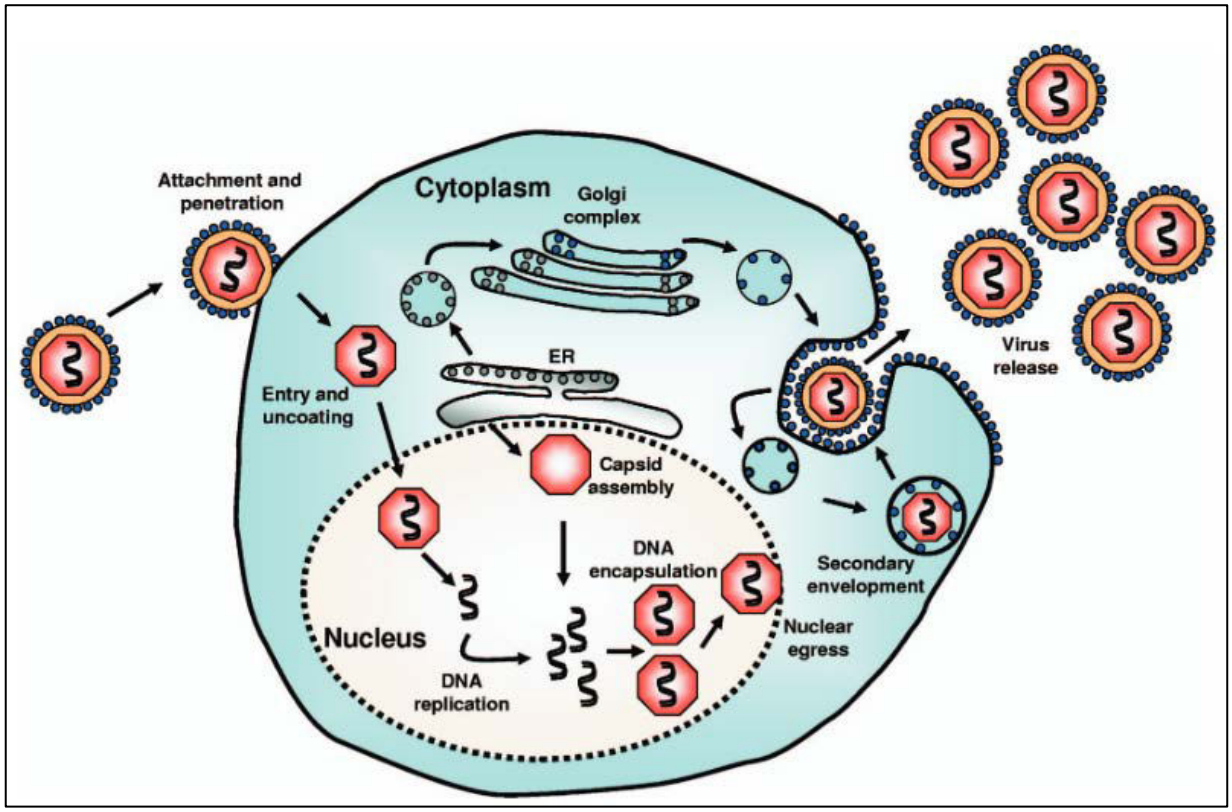


Figure 12. Cycle de réplication du HCMV. (D'après Crough & Khanna, 2009)

i. Ancrage et pénétration du CMV dans la cellule hôte

L'ancrage du virus met en jeu des interactions de basse affinité entre les protéines de l'enveloppe virale gM/gN et/ou gB et les protéglycanes héparine sulfate de la matrice extracellulaire. Cependant, bien que strictement requises, ces interactions ne sont pas suffisantes pour l'infection. Elles sont suivies de l'attachement du virus à ses récepteurs présents sur la membrane de la cellule hôte et au recrutement de co-récepteurs permettant la fusion de l'enveloppe virale avec la membrane cellulaire et la libération de la capside dans le cytoplasme.

Il n'existe pas de récepteur spécifique connu au HCMV. En effet, la grande variété de protéines cellulaires susceptibles d'interagir avec les glycoprotéines de l'enveloppe rend difficile l'identification d'un récepteur cible. Le récepteur EGFR (Epidermal Growth Factor Receptor) a tout d'abord été identifié comme permettant l'amarrage du virus à la membrane, par son interaction avec la protéine virale gB (Wang et al. 2003). Cependant, une étude plus récente a montré que ce récepteur n'interviendrait pas dans l'entrée du virus (Isaacson et al. 2007).
Le récepteur PDGFR-alpha semble aussi être nécessaire à l'entrée du virus dans les fibroblastes (Soroceanu et al. 2008). Une autre étude a également mis en évidence une augmentation de l'entrée de la souche virale de laboratoire AD169 dans les cellules HEK 293 et la lignée pro-monocytaire THP-1, en présence de la protéine BST2/Tetherin qui jouerait le rôle de récepteur permettant l'entrée du HCMV dans la cellule. ((Viswanathan et al. 2011). D'autres interactions entre les glycoprotéines de l'enveloppe et les intégrines cellulaire participeraient aussi à l'entrée du virus (Feire et al. 2004). L'intégrine alpha V Beta 3 notamment, servirait de co-récepteur favorisant la pénétration du virus dans la cellule hote (Wang et al. 2005) . C'est la fixation des protéines gB et gH aux éléments de la matrice extracellulaire qui provoque un réarrangement de la membrane de phospholipide et le rapprochement des récepteurs et des intégrines. Ce phénomène permet la pénétration du virus dans la cellule hôte. Dans le cas spécifique des cellules endothéliales et épithéliales, le HCMV pénètre par un mécanisme d'endocytose à pH acide (Ryckman et al. 2006) mettant notamment en jeu les protéines gH et gL.(Adler & Sinzger 2009). Dans les cellules dendritiques, un mode de pénétration du CMV par macropinocytose indépendante du pH a également été décrit (Haspot et al. 2012). L'interaction du virus avec divers récepteurs cellulaires induit une activation du métabolisme cellulaire avant même que le virus ne pénètre dans la cellule. Les protéines du cytosquelette sont ensuite mises en jeu pour permettre le transit du virion vers le noyau de la cellule. Il s'ensuit plusieurs étapes impliquées dans l'expression des gènes viraux.

ii. Etape très précoce

Cette phase correspond à la transcription de gènes primaires très précoces (IE) et dure entre 2 et 4h. Les protéines d'expression très précoce activent la transcription de gènes viraux et cellulaires et entraine la régulation de la transcription en agissant sur leur propre promoteur. Cette étape permet au virus de s'approprier le métabolisme cellulaire en faveur de sa réplication et aux dépends de la transcription de l'ADN cellulaire.

iii. Etape précoce

Cette phase se déroule entre la mise en route de l'expression des protéines très précoces et le début de la synthèse de l'ADN viral. Deux pics de synthèse ont été mis en évidence in vitro : à 18 et 24 heures et à 60 et 80 heures après infection. A ce stade, le génome se circularise et la protéine UL84 initie la réplication en entrainant le déroulement de l'ADN. La polymérase virale UL54 et sa protéine accessoire UL44 déclenchent alors la synthèse de l'ADN viral.

iv. Etape tardive

Au cours de cette phase, les protéines de structure sont produites et l'ADN viral subit une maturation. L'ADN viral synthétisé sous forme de concatémères est clivé au niveau de séquences *pac* et empaqueté dans des capsides. L'assemblage débute dans le noyau 48h après le début de l'infection. L'encapsidation entraine la production de 3 types de particules virales : des virions complets, des corps denses et des particules non infectieuses telles que les capsides contenant un génome tronqué ou absent. Une enveloppe temporaire de la nucléocapside est constituée par la membrane interne du noyau puis est remplacée par bourgeonnement à partir du système sécrétoire.

f. Mécanismes de latence et de réactivation

Comme tous les herpès virus, le CMV peut demeurer latent dans certains types cellulaires, notamment les cellules endothéliales et les cellules de la lignée myéloïde. La primo-infection par le CMV des individus immunocompétents est généralement asymptomatique et peut aboutir à l'installation d'un phénomène de latence. Aux Etats-Unis, il a été estimé qu'environ 60% de la population a pu être infectée par le virus au cours de la petite enfance et par conséquent, est donc exposé à un risque de réactivation virale.

De nombreux facteurs pouvant induire une réactivation du CMV ont été identifiés : en particulier, l'altération du système immunitaire, le stress cellulaire et l'intervention de processus inflammatoires (Yatim & Albert 2011).

Les mécanismes qui sous-tendent les phénomènes de quiescence et de réactivation sont complexes et font à la fois intervenir des gènes spécifiques de la cellule hôtes et des gènes viraux. Des travaux suggèrent d'ailleurs que le HCMV est particulièrement actif sur le plan transcriptionnel pendant la phase de latence (Cheung et al. 2006). En outre, il a également été montré que le MCMV établirait plus une latence au niveau moléculaire plutôt que sur la base d'une maintenance d'un faible niveau de réplication virale, notamment au niveau de la rate et des reins (Pollock & Virgin 1995). Au niveau du cerveau, des phénomènes de réactivation du MCMV ont également été décrits, en particulier au sein des cellules endothéliales et des progéniteurs neuraux, 90 jours après l'infection néonatale des animaux et transferts des tranches de cerveau en culture (Tsutsui et al. 2002).

D'autres études réalisées chez la souris et le cochon d'inde ont notamment confirmé le rôle joué par les cellules de la lignée myéloïde dans les phénomènes de latence virale et l'importante contribution des lymphocytes et des NK dans le processus de réactivation (Koszinowski 1998)(Reddehase & Grzimek 2002).

Ces résultats suggèrent le rôle potentiel des cellules myéloïdes dans la physiopathologie des infections cérébrales par le CMV, et en particulier, comme nous l'aborderons plus loin dans notre modèle, dans la stratégie de dissémination virale au sein du cerveau fœtal et dans les conséquences neuroinflammatoires constatées.

3. Les modèles animaux d'infection congénitale à CMV et les mécanismes physiopathologiques suspectés

La complexité des interactions entre le CMV et l'organisme hôte rend particulièrement ardue la modélisation des ces infections. Néanmoins la mise au point de modèle animaux a tout de même permis de commencer à déchiffrer, au moins en partie, les processus physiopathologiques mis en jeu. Ces modèles sont variés, sur le plan de l'espèce animale utilisée, de la souche virale inoculée, du stade auquel l'infection est réalisée, du mode d'inoculation, ou encore des méthodes d'analyse utilisées (**Tableau 3**).

Il est ainsi important de garder à l'esprit que ces modèles ont leurs limites et que chacun d'eux, pris séparément, ne peut récapituler l'ensemble des aspects biologiques et cliniques de la pathologie humaine ; et qu'il est nécessaire, autant que faire se peut, de disséquer les différents évènements de l'infection congénitale, ses nombreuses étapes, et ce à différents niveaux d'analyse ; chaque modèle apportant un part d'explication, vraie et incomplète à la fois.

Ainsi, dans la partie qui suit, nous présenterons les principaux modèles animaux et nous discuterons de leurs avantages et de leurs inconvénients. Nous traiterons plus spécifiquement du modèle murin qui a contribué au cours des dernières années, à préciser certains des mécanismes impliqués dans la pathogenèse des infections congénitales à CMV.

Animal	Ordre	CMV	Taille du Génome viral	Transmission verticale	Pathologies /Modèle	Références
Chimpanzé	Primate	CCMV	~241 000 bp	non connue	non étudiée	*Cheeran et al, 2009*
Macaque Rhesus	Primate	RhCMV	~221 000 bp	douteuse	anomalies hématologiques et neurologiques (polymicrogyrie, altérations de la substance blanche)	*Lockridge, K M et al J Virol 1999, Tarantal et al 1998*
Porc	Artiodactyle	PCMV	Séquençage incomplet	Oui	peu étudié (modèle potentiel de maladie vasculaire)	*Edington, N, 1988*
Cochon d'inde	Caviomorphe	GPCMV	~233 000 bp	Oui	Troubles neurologiques, altération des organes périphériques, atteinte cochléaire et troubles de l'audition, phénomènes inflammatoires	*Griffith, B. P et al, 1982, Keithley, E. M et al, 1989 Katano H et al, 2007*
Tupaïa	Scandentien	TCMV	~195 000 bp	non connue	non étudiée	*Cheeran et al, 2009*
Rat	Rongeur	RCMV	~230 000 bp	non excepté pour la souche all-03	Modèle de maladie vasculaire. Aucune étude sur les conséquences neurologiques	*Loh, Hwei-San et al, 2006, Streblow DN et al, 2005*
Souris	Rongeur	MCMV	~230 000 bp	Non	Modèle d'altération neurodéveloppementale (retard de croissance, microcéphalie, porencéphalie) et de déficits neurosensoriels (troubles de l'audition) Modèle de neuroinflammation	Tsutsui, 1995, Li, R. Y., and Y. Tsutsui, 2000 Tsutsui et al, 2005, Cheeran et al, 2004 Kosmac et al, 2013 Sakao-Suzuki et al, 2014

Tableau 3. Les modèles animaux d'infection congénitale par le CMV (adapté de Maxim C-J Cheeran et al., 2009)

a. Le chimpanzé (CCMV)

Le CCMV aurait pu faire un excellent modèle d'infection congénitale, en raison de sa promiscuité avec l'espèce humaine. Cependant, les chimpanzés sont une espèce protégée, particulièrement coûteuse et de disponibilité restreinte.

b. Le macaque Rhésus (rhCMV)

Une alternative est l'utilisation du macaque rhésus, qui est couramment employé en expérimentation animale. Des modèles d'infection périnatale par son CMV spécifique (RhCMV) ont été développés et montrent de fortes similarités avec la pathologie humaine, notamment sur le plan des anomalies neurologiques constatées chez les fœtus infectés (Tarantal et al. 1998).
Les génomes du RhCMV et du HCMV présentent un fort degré d'homologie (Hansen et al. 2003) et des souches virales mutantes pour des gènes orthologues du virus humain ont également été créés (Lilja et al. 2008).
Cependant, les coûts élevés de maintenance des animaux, la longueur de la période gestationnelle et la faible proportion d'animaux séronégatifs en raison du nombre important de ces infections dans les colonies de macaques, font obstacle à l'utilisation de ces animaux.

c. Le cochon d'Inde (GPCMV)

De nombreux autres modèles animaux, en particulier chez les rongeurs ont été développés. L'infection congénitale par le CMV (GPCMV) chez le cochon d'inde représente, parmi les rongeurs, l'unique modèle de transmission verticale du virus. (Griffith et al. 1982) (Schleiss 2006). De plus, les animaux infectés au cours de la gestation présentent une virémie systémique à la naissance associée à l'émergence de troubles neurologiques et d'un déficit auditif qui récapitulent ainsi de manière assez fidèle la pathologie humaine (M. C.-J. Cheeran et al., 2009). Les limites de ce modèle résident dans la nécessité d'utiliser des doses virales très importantes pour induire une infection, ce qui provoque une mort fœtale souvent massive obligeant à l'utilisation d'une grande quantité d'animaux, et donc limitant les possibilités d'étude. De plus, la durée de gestation reste relativement longue (entre 65 et 70 jours) comparée aux autres rongeurs et la taille moyenne des portées n'excède pas trois nouveau-nés par gestante.

d. Les modèles murins

L'infection par le CMV murin (MCMV) a été le modèle le plus couramment utilisé pour étudier les mécanismes physiopathologiques mis en jeu au niveau du SNC. Le génome et le protéome du MCMV ont été très bien caractérisés et la disponibilité de nombreuses souches mutantes du virus a notamment permis de comprendre certains aspects de la réponse immunitaire à l'infection (Saederup et al. 2001)(Mitrovic et al. 2012). A l'instar du RCMV, un des désavantages majeurs de ce modèle est l'impossibilité de transmission verticale du virus.

En effet, le MCMV est incapable de traverser la barrière placentaire en raison des caractéristiques anatomiques du placenta de souris à savoir, la présence d'une triple couche de trophoblastes.

De nombreuses équipes de recherche ont mis au point différentes stratégies alternatives d'inoculation du virus au cours du développement *in utero* ou durant les stades postnataux précoces **(Tableau 4).** Sur le plan technique, l'infection prénatale du SNC par le MCMV peut être établit, soit par inoculation directe du virus dans les ventricules cérébraux (voie intracérébroventriculaire) (Tsutsui et al. 1989) (Tsutsui et al. 1991), par injection dans le corps de l'embryon (Voie intrapéritonéale) (Tsutsui 1995)(Fig et tableau) ou encore par voie transplacentaire (Li & Tsutsui 2000) (Sakao-Suzuki et al. 2014).
Dans les modèles d'infection néonatale, l'infection virale est principalement effectuée par voie intrapéritonéale chez les nouveau-nés (Koontz et al. 2008) (Kosmac et al. 2013) (Kawasaki et al. 2015) ou via le lait maternel. (Wu et al., 2011).

Références	Charge virale inoculée	Voie	Stades d'infection	Stades d'observation	Principaux résultats
Tsutsui, 1991	entre 10^2 et 10^3 PFU	ICV	E15	P21	Porencéphalie, lésions inflammatoires, nodules microgliaux
Shinmura et al, 1997	$2X10^3$ PFU	ICV	E15,5	E16,5, P7	Altération de la migration neuronale
Li RY et Tsutsui, 2000	10^3 PFU	IPL	E12,5	E18,5, P7	Retard de croissance, microcéphalie
Van Den Pol et al, 2007	$2x10^4$ PFU/g	IC	P1, P7	P5, P12	Rôles des interférons Altérations électrophysiologiques des neurones infectés
Koontz et al, 2008	200 PFU	IP	<P1	P5, P7, P9, P11, P14, P28	Inflammation, infiltration de mononucléaires, altération morphologique du cervelet
Cheeran et al, 2011	200 TCID50	IC	P0	P7	Perte en cellules souches neurales, réduction de leur prolifération et du nombre de neurones matures
Kosmac et al, 2013	500 PFU	IP	P0	P8	Rôles de l'inflammation et de l'infiltration de mononucléaires dans l'altération du développement du cervelet
Sakao-Suzuki et al, 2014	10^5 PFU	IPL	E12,5	E13,5, E15,5, E17,5	Rôle *in utero* de la microglie et des macrophages. L'activation de ces cellules à un effet délétère sur le développement cérébral
Kawasaki H et al, 2015	10^5 PFU	ICV / IP	P0	P1, P2, P4	Les cellules exprimant un fort taux d'intégrine beta sont les premières cibles du CMV
Bradford RD et al, 2015	50-200 PFU	IP	P0	P11, P14, P40-50	Déficit auditif, infiltration de mononucléaires dans la cochlée et perte neuronale dans le ganglion spiral

Tableau 4. Les principaux modèles murins d'infection congénitale à CMV

i. Les différentes voies d'administration du MCMV et les conséquences neurosensorielles de l'infection.

- Administration i.p du MCMV chez le nouveaux-né.

Les modèles d'infection basés sur l'inoculation intrapéritonéale du MCMV chez le nouveau-né ont été beaucoup utilisés et présentent l'avantage de reproduire de manière assez fidèle la voie naturelle de transmission du virus, à savoir, en premier lieu, via la circulation systémique, permettant au virus de se répliquer dans les organes périphériques avant d'atteindre le parenchyme cérébral. En outre, sur le plan du développement du SNC, il est classiquement établi qu'un souriceau nouveau-né équivaut à un fœtus humain de 15 semaines environ.(Finlay 2008). Par ailleurs, les infections congénitales par le HCMV sont particulièrement fréquentes au cours du second trimestre de gestation. (Enders et al. 2011). Cependant, cette concordance temporelle entre le fœtus humain la souris en néonatal n'est pas absolue et dépend de la structure cérébrale étudiée, des méthodes d'analyse utilisées et des événements périnataux qui sont conditionnés par l'accouchement. Les auteurs considèrent néanmoins que leur modèle permet l'étude des infections congénitales par le CMV.. Ce modèle permet également de s'affranchir de la barrière placentaire, qui, comme déjà évoqué ci-dessus, constitue un obstacle à la transmission du virus chez la souris. A l'issue de l'administration en i.p chez le nouveau-né, le MCMV peut être détecté dans le plasma et les cellules sanguines circulantes.

Dans le modèle de Koontz et al., l'injection i.p conduit d'abord à une infection des organes périphériques, notamment du foie et des poumons. Autour du stade P8, le MCMV est ensuite détecté dans différentes régions cérébrales, comme les méninges, l'hippocampe, les régions periventriculaires, le cervelet, et regroupé sous forme de foyers infectieux(Koontz et al. 2008). Des désordres de la lamination du cortex cérébelleux ont également été mis en évidence dans ce modèle, mais ces anomalies corticales semblent être adjacentes aux foyers infectieux et ne sont pas spatialement corrélées à la présence du MCMV et de cellules inflammatoires. Les neurones de Purkinje présentent également des signes d'altération, notamment une réduction de leur arborisation dendritique responsable d'un amincissement de la couche moléculaire du cervelet ainsi qu'un défaut d'alignement cellulaire au niveau de la couche granuleuse.

Les nouveau-nés infectés par le MCMV présentent des anomalies neurodéveloppementales, notamment du cervelet qui semblent très similaires à celles observées chez les nourrissons lors d'examens d'imagerie cérébrale.

Parmi ces anomalies ont été identifiés : une diminution de la foliation cérébelleuse traduisant une dysplasie cérébelleuse, ainsi qu'une réduction de la surface du cervelet couplée à un amincissement de la couche granulaire externe (CGE). (Koontz et al. 2008), (Kosmac et al. 2013) (Simonazzi et al. 2010) (Manara et al. 2011).

De manière intéressante, toutes ces altérations morphologiques semblent être une spécificité du cervelet et n'ont pas été retrouvées au niveau du cortex cérébral. Contrairement à ce dernier, le cervelet possède un développement post-natal particulièrement actif, ce qui peut expliquer la préférence du MCMV pour cette structure et l'impact de l'infection sur son organisation cellulaire.

La présence d'un déficit auditif, qui est une des conséquences majeure de ces infections congénitales, a également été objectivée dans une étude récente chez des nouveau-nés infectés par en i.p par le MCMV. Dans ce modèle, les auteurs ont pu mettre en évidence des caractéristiques cliniques très proches de la pathologie humaine. En particulier, une apparition relativement tardive des symptômes chez les souriceaux et une perte d'audition progressive et unilatérale. De plus, l'infection de ces animaux conduit à une inflammation de l'oreille interne accompagnée d'une dégénérescence neuronale du ganglion spiral constatée autour de P11, qui aurait pour conséquence secondaire une désafférentation cochléaire (Bradford et al. 2015)

- Administration intraplacentaire du MCMV.

Bien que les modèles d'infection au cours de la période néonatale décrits précédemment reproduisent assez bien la pathologie humaine notamment sur le plan la dissémination initialement systémique du MCMV, ils font néanmoins abstraction de la transmission materno-fœtale du virus et de l'environnement *in utero,* qui jouent un rôle majeur dans la pathogenèse de ces infections. En particulier, le placenta, organe se trouvant à l'interface du fœtus et de la mère, constitue à la fois une porte d'entrée et un réservoir au virus permettant sa dissémination dans l'organisme fœtal (Fisher et al. 2000). De plus, l'infection placentaire peut engendrer des conséquences hémodynamiques délétères pour le fœtus, pouvant induire une réduction de l'apport en oxygène (M. C.-J. Cheeran, Lokensgard, & Schleiss, 2009).
Afin de reproduire au mieux cette voie de transmission du MCMV, des modèles d'administration intraplacentaire du virus ont été mis au point. L'inoculation du virus dans ces modèles est réalisée généralement entre E12.5 et E13.5.

Après avoir confirmé l'existence de foyers infectieux dans les placenta injectés, Li et Tsutsui ont pu mettre en évidence une transmission virale du placenta au fœtus dans près de 50% des cas (Li & Tsutsui 2000). De plus, la présence de l'ADN du MCMV dans le cerveau a été retrouvée chez environ 30% des embryons infectés par voie transplacentaire. Dans ce modèle, les auteurs démontrent le tropisme du MCMV pour le cerveau et sa localisation principalement periventriculaires. Plus précisément le MCMV est détecté au niveau des zones ventriculaires et subventriculaires qui constituent la matrice germinale, riche en cellules souches neurales et précurseurs neuronaux. En parallèle, les auteurs ont testé l'influence de l'injection intraplacentaire de TNF-alpha sur la transmission materno-fœtale du MCMV, injecté dans ce cas par la veine de la queue chez la femelle gestante. Malgré une nette augmentation de la susceptibilité d'infection dans le groupe des placentas prétraités au TNF-alpha, l'ADN du MCMV a été retrouvé dans moins 6% des cas au niveau du foie et aucune trace du virus n'a été détectée dans le cerveau. Dans ce modèle les auteurs ont également mis en évidence la présence d'un retard de croissance et d'une microcéphalie chez les animaux à P7

Récemment, un nouveau modèle d'infection i.pl par le MCMV à E13.5 a été caractérisé.
Dans cette étude, Sakao-suzuki et al ont d'une part caractérisé la distribution intracérébrale et la dynamique de l'infection *in utero*, et d'autre part précisé les types cellulaires infectés aux stades embryonnaires précoces. La protéine IE1 du MCMV est principalement retrouvée dans des cellules endothéliales des méninges, et au sein du parenchyme cérébral, dans les macrophages périvasculaires, les péricytes et les cellules souches neurales. De surcroît, les auteurs ont également mis en exergue l'intervention de processus neuroinflammatoires survenant précocement au cours du développement embryonnaire, en réponse à l'infection.

En plus d'un retard de croissance et d'une microcéphalie, l'existence d'un déficit auditif éventuel a également été objectivée dans l'un de ces modèles d'infection intra placentaire par le MCMV. (Juanjuan et al. 2011). Suite à l'administration du virus à E12.5, les auteurs ont mis en évidence la présence d'un déficit auditif chez les animaux aux stades postnataux P28 et P70. A l'instar de l'étude récente de Bradford et al., les auteurs avaient également montré que le perte neuronale au sein du ganglion spiral pouvait potentiellement être la cause des troubles auditifs chez les animaux infectés par voie intraplacentaire.

- Administration intracérébrale ou intracerébroventriculaire chez le nouveau-né et l'embryon.

De nombreux modèles d'infection par le MCMV ciblant directement le cerveau ont été développés au cours des années 90. Bien que ces modèles semblent peu fidèles au mode de transmission naturelle du CMV, ils présentent l'avantage - à première vue paradoxal - de s'affranchir de la réponse immunitaire maternelle, de la barrière placentaire et de la BHE du fœtus. De ce fait, ces modèles pourraient permettre d'étudier plus spécifiquement l'interaction directe entre le CMV et les cellules cérébrales, et les conséquences de l'infection au niveau de différents processus de développement du cerveau, et des pathologies neurodéveloppementales associées.

Ainsi, toute interférence en amont, qui pourrait éloigner le modèle des réalités physiopathologiques de l'infection congénitale humaine en particulier les différences entre les systèmes immunitaires et entre les structures placentaires) est-elle en quelque sorte court-circuitée, rendant le modèle ainsi simplifié, plus homogène.

Deux voies d'inoculation du MCMV dans le cerveau embryonnaire ou néonatal sont couramment utilisées : intracérébrale (IC) et intracerébroventriculaire (ICV).

Dans le cas de la voie ICV, le virus est injecté dans une cavité ventriculaire, notamment du ventricule latéral, où circule le LCR, dont l'orientation du flux favorise la dissémination rostro-caudale du virus (Sakka et al. 2011). De plus, au niveau de la lumière ventriculaire baignent les plexus choroïdes, structures composées de cellules épithéliales richement vascularisées impliquées dans la sécrétion du LCR et en continuité avec le neuroépithélium ventriculaire. La barrière sang-LCR est largement exploitée par les virus pour envahir le parenchyme cérébral. Un certain nombre d'études ont d'ailleurs montré que les plexus choroïdes étaient une cible majeure du virus (Naruse & Tsutsui 1989), (Tsutsui 1995), (Sakao-Suzuki et al. 2014), (Teissier et al. 2014), (Kawasaki et al. 2015). Y. Tsutsui, un des pionniers de l'inoculation du MCMV par voie ICV, a largement contribué à étudier les effets de l'infection au niveau du cerveau embryonnaire. Ainsi, les premiers modèles d'une infection cérébrale *in utero* chez la souris ont vu le jour. Dans ces études pilotes ont pu être mis en évidence les effets délétères du MCMV, notamment sur la migration neuronale, avec pour conséquence des altérations morphologiques importantes du tissu cérébral.

Ces premières études ont fait notamment état de la présence de nombreuses anomalies anatomiques comme une ventriculomégalie, une hydrocéphalie, une porencéphalie, des lésions kystiques periventriculaires, des nodules microgliaux ou encore une atrophie cérébrale.
Par ailleurs, chez le fœtus humain, certaines de ces anomalies cérébrales sont retrouvée au cours d'une infection cérébrale par le CMV (Malinger et al. 2003) (Simonazzi et al. 2010).

Sur le plan cellulaire, des défauts de la migration neuronale ont été rapportés, notamment par les travaux de Shinmura et al (Shinmura & Kosugi 1997). Dans cette étude, les auteurs montrent, après injection du MCMV par voie ICV à E15.5 et de BrdU 6h ou 72h après, une perturbation de la migration et une perte neuronale importante à P7.

Certaines études, exclusivement postnatales **(Tableau 4)**, ont employé la voie d'inoculation intracérébrale. Le virus est dans ce cas administré soit par injection intra-cortical au niveau des hémisphères cérébraux (Kosugi, Kawasaki, Arai, & Tsutsui, 2002), (Ishiwata et al. 2006), (Mutnal, Cheeran, et al. 2011a) ou par injection sous-corticale pour atteindre des structures comme l'hippocampe, le striatum ou l'hypothalamus (van Den Pol et al. 1999). Comme nous l'avons précédemment évoqué, il ressort de ces études, notamment celle de Van den Pol et al, que toutes les cellules présentes dans le cerveau peuvent être infectées par le MCMV, même si certains types cellulaires comme les cellules gliales radiaires (progéniteurs neuraux), semblent avoir un degré de susceptibilité plus important.

En dépit de la grande diversité de ces modèles murins notamment en termes de voie d'administration, de leur capacité à reproduire certaines des manifestations cliniques observées dans la pathologie humaine, et, aussi, de leur complémentarité, les mécanismes physiopathologiques responsables de l'apparition de troubles neurodéveloppementaux ne sont toujours pas clairement élucidés **(Figure 14).**

ii. Mécanismes physiopathologiques suspectés dans les modèles murins

Comme je l'ai évoqué dans le chapitre I, les altérations causées par une infection virale au sein du SNC peuvent résulter de l'infection et de la lyse des cellules cérébrales, ou d'un effet secondaire sur le fonctionnement de ces cellules, possiblement médié par des processus neuroinflammatoires.

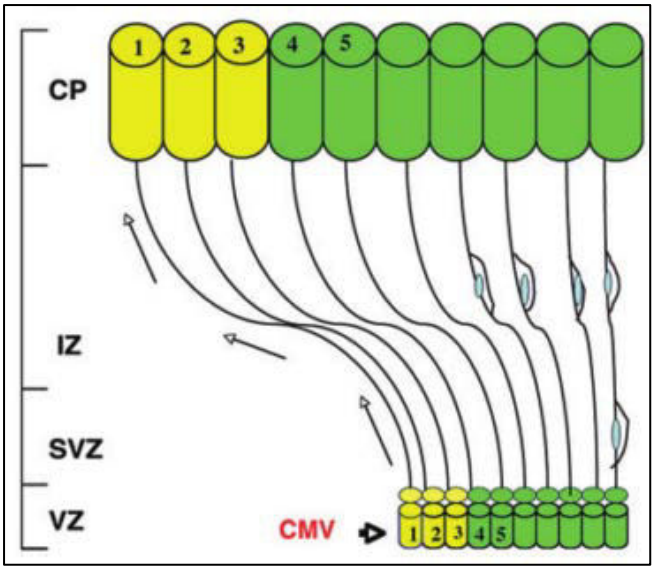


Figure 13. Représentation schématique de l'infection par le CMV au cours des différentes étapes du développement cérébral. (D'apreès Yoshihiro Tsutsui, 2009)

Au cours du développement cérébral, les cellules souches neurales prolifèrent au niveau des zones ventriculaires (VZ) et subventriculaires (SVZ) et vont migrer le long des fibres gliales radiaires, traverser la zone intermédiaire (IZ) et venir se positionner dans la plaque corticale (CP) pour se différentier en neurones fonctionnels. L'infection par le CMV peut altérer une ou plusieurs de étapes de cette séquence développementale.

Dans le cas des infections par le CMV au cours du développement cérébral *in utero*, les effets du virus dans le cerveau fœtal pourraient être causés par l'infection des cellules souches neurales et des progéniteurs neuraux, provoquant l'altération de leur capacité de prolifération, de migration ou de différentiation **(Figure 13)**.

Comme mentionné précédemment, les cellules souches neurales localisées au niveau de la VZ et de la SVZ ont la capacité de proliférer (neurogenèse), de migrer et de se différentier en neurones, astrocytes, et oligodendrocytes et le bon déroulement de cette séquence développementale va conditionner un fonctionnement cérébral optimal

Différents mécanismes cellulaires et moléculaires associés à l'infection par le CMV ont été envisagés et permettent en théorie d'expliquer, au moins en partie, l'émergence d'anomalies du développement cérébral. Cependant, ces concepts doivent encore être précisés et pour la plupart démontrés. L'étude des modèles animaux a mis en exergue plusieurs mécanismes possibles : **(Figure 14)**

L'infection des cellules souches neurales, altérant leur capacité de prolifération ou d'autorenouvèlement **(1)** et/ou la perturbation de la différentiation de ces cellules en progéniteurs intermédiaires **(2)**, pouvant avoir des répercussions sur la taille du cerveau (microcéphalie) ou sur le fonctionnement des futurs réseaux neuronaux. (Épilepsie, paralysie cérébrale). L'altération de la migration des neuroblastes (**3**) et/ou de leur différentiation finale en neurone ou astrocyte, processus critiques déterminant l'architecture et l'activité des neurones matures (**4**) L'infection et la lyse des astrocytes, cellules gliales dont la fonction est indispensable au développement de circuits neuronaux fonctionnels **(5)**.

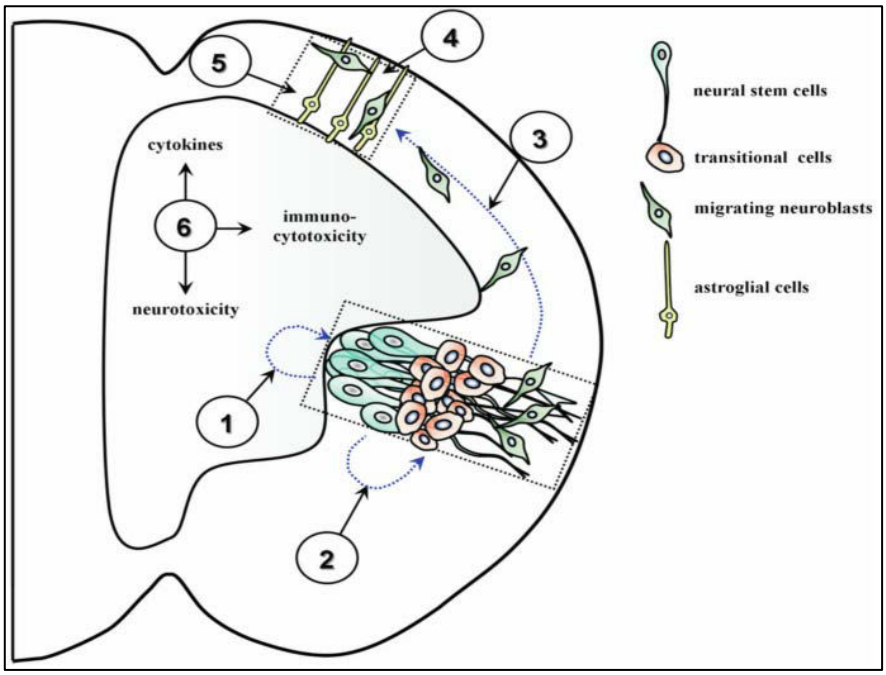


Figure 14. Représentation schématique des mécanismes physiopathologiques possible au cours des infections congénitales à CMV. (D'après Maxim C-J Cheeran et al., 2009).

La réponse immunitaire cérébrale à l'infection, notamment par le biais de la libération de facteurs comme les chimiokines, de l'activation microgliale et de l'attraction de cellules immunitaires périphériques, peut à la fois impacter les phénomènes précédemment cités, mais également, via des processus neurotoxiques, altérer directement la physiologie neuronale. **(6)**

Un certain nombre d'études suggèrent que la réponse immunitaire à l'infection par le CMV au cours du développement cérébral pourrait être à l'origine des anomalies cérébrales observées. En effet, chez la souris, bien que les anomalies morphologiques soient temporellement corrélées à la réplication cérébrale du MCMV, il existe pourtant un contraste marqué entre l'ampleur des altérations cérébrales observées et le faible nombre de cellules infectées. Les études des modèles murins ont également mis l'accent sur l'intervention possible, au cours de l'infection du cerveau fœtal (Sakao-Suzuki et al. 2014) et neonatal (Kosmac et al. 2013) par le MCMV, des cellules résidentes du SNC, en particulier la microglie, de cellules immunitaires périphériques et de médiateurs pro inflammatoires comme les cytokines.

Comme nous l'aborderons dans le prochain chapitre, les cellules microgliales peuvent être activées et recrutées sur le site de l'infection, notamment sous l'effet des chimiokines libérées par d'autres types cellulaires .(Cheeran et al. 2001), (Cheeran et al. 2003).

Cependant leur rôle réel dans la dissémination du CMV, dans la survenue d'anomalies cérébrales, et dans leurs conséquences cliniques, reste encore à élucider.

e. Les modèles chez le rat

Le CMV de rat (RCMV) a très bien été caractérisé sur le plan biologique et moléculaire et la séquence complète de son génome est disponible (Cleef 2007). Des souches virales mutantes ont été développées et caractérisées notamment dans le contexte de l'étude du chimiotactisme de cellules immunitaires (Vomaske et al. 2012). Ce virus a principalement été utilisé pour étudier les infections à CMV associées aux pathologies vasculaires (Streblow et al. 2005) (Kelley et al, 2008). Cependant, le RCMV ne conduit pas à l'émergence d'une infection congénitale. En effet, le virus n'a pas été retrouvé dans les embryons de rats après infection des femelles gestantes, probablement en raison des caractéristiques réfractaires au RCMV de la barrière placentaire du rat (Priscott & Tyrrell 1982). En 2003, Loh et al ont bien identifié une nouvelle souche de RCMV isolée à partir de placenta de rat naturellement infectés (Loh et al. 2003) ; si cette souche virale (ALL-03) est effectivement capable après inoculation systémique dans la rate gestante de traverser le placenta et donc d'infecter le fœtus congénitalement, cependant le virus n'a pas été détecté dans le cerveau des fœtus infectés dans ce modèle de transmission verticale (Loh et al. 2006). De ce fait, cette souche virale n'a pour l'instant pas été utilisée pour modéliser les conséquences cérébrales lors d'une infection congénitale.

Conclusion du chapitre II

Les infections congénitales à CMV représentent un véritable enjeu économique, médical et scientifique. Il n'existe à ce jour aucun traitement préventif ou curatif approuvé, et les mécanismes conduisant à l'émergence de pathologies neurodéveloppementales sont encore à préciser. Même si dans la grande majorité des cas, la transmission materno-fœtale du virus n'est pas associée à la présence de symptômes chez les nouveau-nés, les conséquences à long-terme, en particulier à l'âge adulte ne sont pas connues. Cependant, à l'instar d'autres infections virales survenant au cours de la grossesse, le CMV est fortement suspecté d'être impliqué dans l'étiologie de troubles neuropsychiatriques comme la schizophrénie ou l'autisme (Pearce 2001)(Yamashita et al. 2003).

Le CMV possède un large tropisme cellulaire au sein du SNC et peut tout aussi bien lyser certaines cellules infectées, comme demeurer latent dans certains types cellulaires. Une combinaison de facteurs rendrait le cerveau fœtal plus susceptible aux infections à CMV et à leurs conséquences, et aurait un impact sur la séquence développementale cérébrale.
Même en l'absence d'anomalies morphologiques identifiables, le CMV pourrait de plus laisser une « empreinte cérébrale » de son passage à un stade critique de la mise en place des réseaux neuronaux et causer des troubles neurologiques.

Les modèles murins ont commencé à préciser certains paramètres clés de la physiopathologie de ces infections et en particulier le rôle crucial joué par les processus neuro-immunologiques.

Dans la troisième et dernière partie de cette introduction nous dresserons un état des lieux concernant les connaissances actuelles sur la réponse immunitaire cérébrale à l'infection par le CMV - et plus précisément au cours du développement cérébral. Nous aborderons en particulier le rôle joué par les cellules microgliales au cours de ces infections.

III) Mécanismes neuroimmunologiques mis en jeu au cours des infections à CMV du cerveau en développement.

Le système immunitaire est un véritable réseau interactif mettant en jeu des organes lymphoïdes comme la rate ou le thymus, des cellules spécialisées, et des molécules de signalisation cellulaire comme les cytokines et les chimiokines. La fonction principale du SI est la protection de l'organisme contre les agressions en provenance de l'environnement (virus, bactéries, polluants) mais parfois aussi contre l'organisme lui-même (tumeurs). Le SI peut être divisé en deux parties qui se caractérisent respectivement par leur rapidité et spécificité de réponse : L'immunité innée et l'immunité acquise. L'immunité innée comprend les éléments du SI permettant de fournir une réponse rapide à une attaque de l'organisme. Au sein de ce volet du SI, on trouve les neutrophiles, les monocytes et macrophages, le système du complément ainsi que les molécules de signalisation intercellulaire.

L'immunité acquise, encore appelée immunité adaptative, fait référence aux mécanismes de mémoire immunitaire mis en jeu dès lors qu'un pathogène entre dans l'organisme et permettant une réponse immédiate et spécifique en cas de nouvelle présentation de l'antigène. Comme pour l'immunité innée, le système acquis inclus à la fois des composants cellulaires comme les lymphocytes T et B et humoraux comme les anticorps.

Le SNC étant doté de son propre système de défense, il a longtemps été considéré comme étant coupé de toute relation avec le SI périphérique. L'ensemble des règles qui contrôlent l'accès du SI et son fonctionnement au niveau du SNC définit ce que l'on appelle le privilège immun. Plus précisément, le privilège immun correspond aux mécanismes mis en place par un organe pour tolérer l'introduction d'antigènes en son sein et ne pas induire de réaction immunitaire concomitante. Dans le cas du SNC, le terme de privilège immun a été construit autour de fait qu'il est isolé de la périphérie grâce à la BHE, qu'il dispose de son propre système de défense représenté majoritairement par la microglie et les macrophages résidents et qu'il est dépourvu de système lymphatique. De plus, le SNC est particulièrement pauvre en cellules présentatrices d'antigènes et il dispose même de mécanismes permettant la downregulation des complexes majeur d'histocompatibilité (CMH) notamment au niveau des cellules gliales. (Ousman & Kubes 2012)

Cependant, des données récentes ont dramatiquement changé cette vision en démontrant que le SNC n'était ni isolé, ni passif dans ses interactions avec le SI périphérique.

En effet, dans certaines conditions les cellules immunitaires périphériques peuvent traverser la BHE et interagir avec les cellules résidentes. Les neurones et les cellules gliales régulent les réponses des macrophages et des lymphocytes et la communication microglie-lymphocyte est connue pour être impliquée dans les phénomènes neurotoxiques ou au contraire neuroprotecteurs (Lampron et al. 2013).De plus, une étude récente a pu mettre en évidence la présence de vaisseaux lymphatiques cérébraux au niveau du sinus veineux de la dure mère et ce système lymphatique cérébral est relié au reste du réseau lymphatique périphérique au niveau du nœud lymphatique du ganglion cervical. (Louveau A et al, Structural and functional features of central nervous system lymphatic vessels, Nature, 2015) Cette découverte devrait permettre de mieux comprendre la relation neuroimmunologique qui existe entre le cerveau et le SI périphérique et ouvrir de nouveaux horizons concernant la compréhension des pathologies neuroinflammatoires et neurodégénératives.

Le système immunitaire joue un rôle fondamental de la régulation de l'inflammation. L'inflammation correspond à l'ensemble des réactions générées par l'organisme en réponse à une agression subie. Ces réactions ont normalement pour but la défense de l'organisme en combattant les éléments pathogènes impliqués et en favorisant la réparation des tissus lésés. Cependant, l'inflammation peut aussi avoir des conséquences délétères pour les organes, notamment lorsqu'elle est causée par une infection virale (Takeuchi & Akira 2010). L'inflammation du SNC est reconnue pour jouer un rôle proéminent dans de nombreux processus pathologiques. En effet, de nombreux arguments suggèrent que les phénomènes neuroinflammatoires joueraient un véritable rôle pivot dans les processus physiopathologiques des maladies neurodégénératives (Glass et al. 2010).

Les virus sont particulièrement suspectés d'intervenir directement ou indirectement dans les processus neuroinflammatoires sous-tendant certaines pathologies (Van den Pol, 2006) (Anthony N. van den Pol 2009), notamment en atteignant le cerveau en développement. Comme nous l'avons abordé dans le chapitre précédent, des études récentes témoignent de l'implication de phénomènes neuroinflammatoires au cours des infections congénitales à CMV, mettant notamment une réponse immunitaire cérébrale et périphérique.

1. Les cellules de l'immunité innée au sein du SNC

Afin d'assurer sa protection et son homéostasie, le SNC est continuellement sous surveillance par des cellules spécialisées, capables de détecter la présence d'éléments potentiellement pathogènes et d'induire une réponse immunitaire adaptée. Parmi ces cellules, la microglie et les astrocytes représentent la première ligne de défense permettant de lutter contre les agressions et de coordonner l'action des cellules du SI périphérique.

D'autres cellules de type myéloïde distinctes de la microglie, sont présentes au niveau du SNC, comme les macrophages des plexus choroïdes et des méninges et les macrophages périvasculaires. Les cellules dendritiques (DC) provenant de la différentiation des monocytes, sont également présentes en faibles proportions à proximité des vaisseaux méningés. **(Figure 15)**

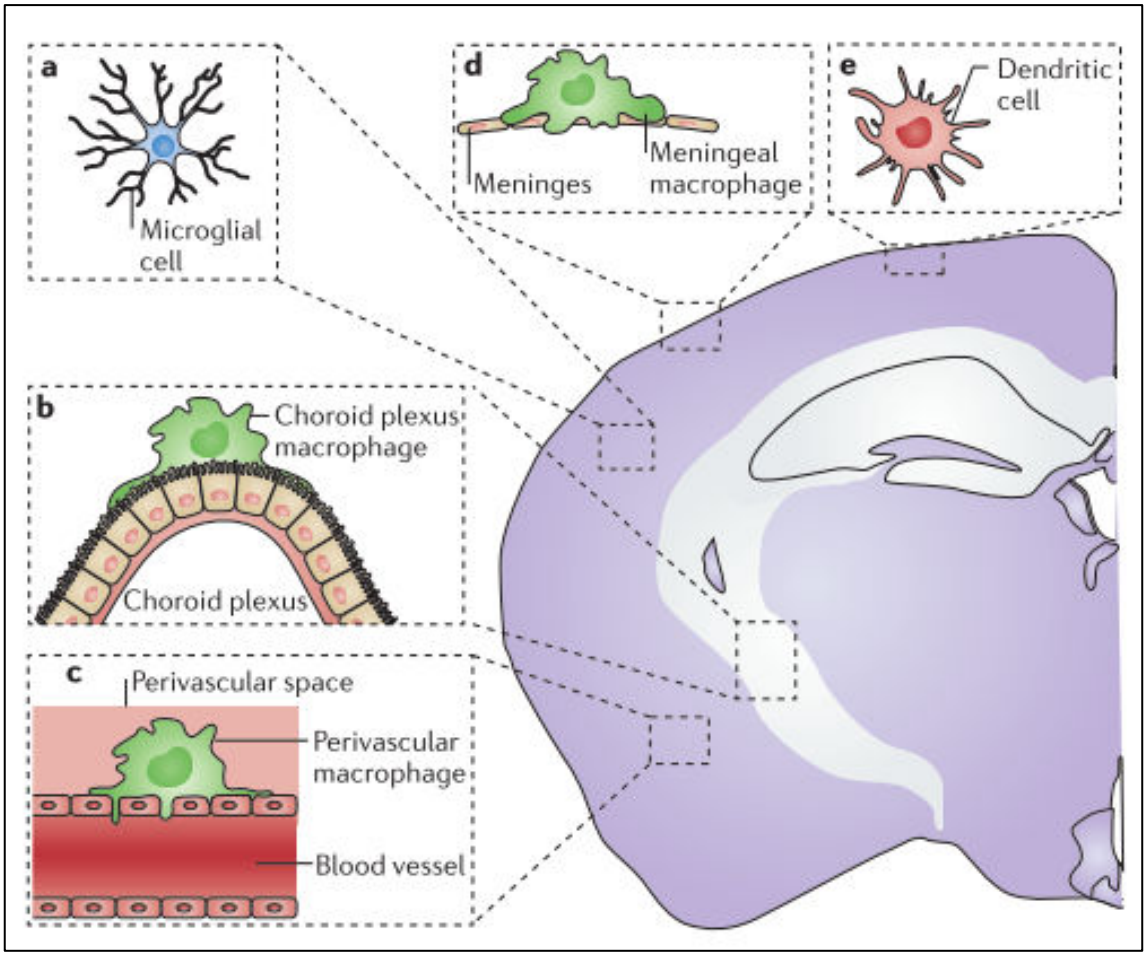


Figure 15. Les différents types de cellules myéloïdes du SNC**.** (à partir de (Prinz & Priller 2014)

a. Les cellules microgliales

i. Origines

Les cellules microgliales sont les macrophages résidents du SNC. Cependant, contrairement aux macrophages périphériques qui proviennent de la différentiation des monocytes la microglie possède une origine développementale bien distincte qui a longtemps été source de débats. Des travaux récents ont pu montrer que la microglie dérivait de précurseurs erythromyéloïdes du sac vitellin (Ginhoux et al. 2010),(Kierdorf et al. 2013) et **Figure 16**. Ces précurseurs colonisent le neuroépithélium à un stade précoce du développement *in utero* (E9.5 chez la souris) pour se différentier en cellules microgliales qui persisteront ensuite dans le cerveau adulte. Une fois établie dans le parenchyme cérébral, la microglie se renouvelle par prolifération *in situ* à partir de précurseurs résidents, indépendamment des monocytes périphériques (Ajami et al. 2007)

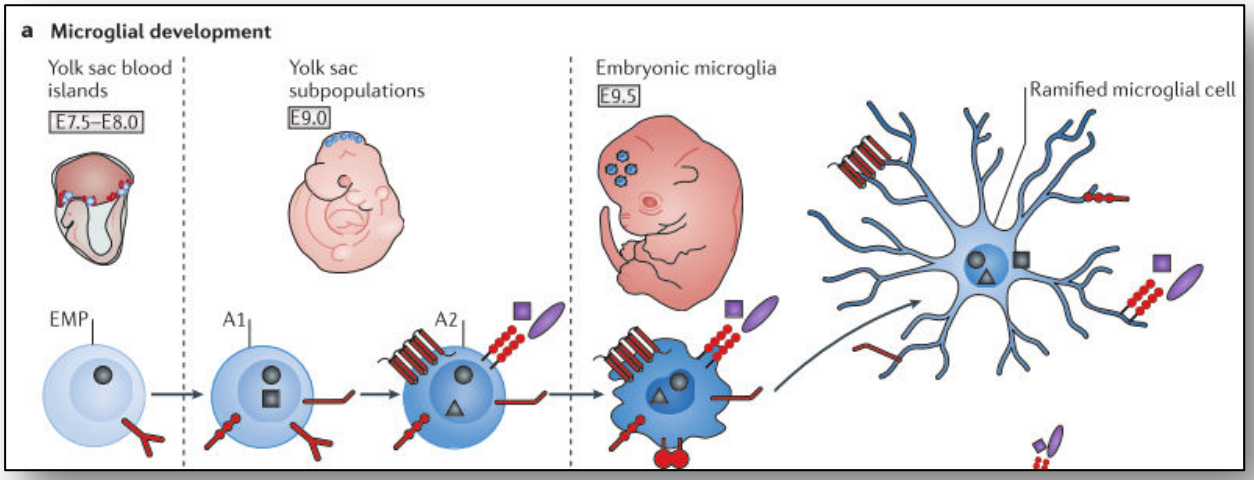


Figure 16. Développement embryonnaire de la microglie chez la souris. (adapté de (Prinz & Priller 2014)

ii. Fonctions de la microglie

La fonction classique de la microglie est de faire office de première ligne de défense contre les agents infectieux et les agressions de toutes sortes qui surviennent au niveau du parenchyme cérébral. Au sein de ce dernier, les cellules microgliales résidentes s'organisent en niches et scannent en permanence leur environnement grâce à la mobilité de leurs extensions cytoplasmiques (Nimmerjahn et al. 2005).

Chez l'humain et le rongeur, la microglie quiescente, en particulier au niveau de la substance blanche, exprime constitutivement de faibles niveaux de CMH II ce qui traduit la capacité de ces cellules à être présentatrices d'antigènes (CPA) (Hayes et al. 1987). En effet, les marqueurs moléculaires de présentation antigénique et d'activation comme le CMH II, CD80, CD86, CD46, CD11a, cD54 et CD58 ((Protul et al., 1996) sont rapidement exprimés à la surface des cellules microgliales en réponse à des modifications pathologiques survenant dans le SNC. De plus, les cellules microgliales ont aussi une fonction permettant la présentation d'antigènes aux lymphocytes T (Ford et al. 1996).

De nombreux travaux démontrent en outre que la microglie joue aussi un rôle crucial dans le maintien de l'homéostasie du SNC. Les cellules microgliales interviennent notamment dans la maintenance et le renouvellement des synapses dans le cerveau adulte, ((Kettenmann et al. 2013), (Tremblay et al. 2010) et constituent un véritable support trophique grâce à la sécrétion de facteurs comme le NGF (Nerve Growth Factor), le BDNF (Brain-derived Neurotrophic Factor), et le GDNF (Glial-cell line-Derived Neurotrophic Factor). Ces facteurs jouent un rôle neuroprotecteur en favorisant survie et la régénération neuronale. La microglie peut également capturer certains neurotransmetteurs comme le glutamate et moduler l'excitabilité neuronale via le BDNF. (Ferrini & Koninck 2013). Comme les macrophages, la microglie peut phagocyter et participer ainsi à la clairance des débris cellulaires et des cellules mortes. En particulier, des données décrivent une action de la microglie sur la remyélinisation, l'oligodendrogenèse, et l'angiogenèse. (Popovich & Longbrake 2008). Au cours du développement du SNC les cellules microgliales exercent aussi des rôles critiques, comme la régulation de la neurogenèse par la phagocytose des précurseurs neuronaux (Cunningham 2013) et des cellules souche neurales en apoptose qui ne doivent pas être incorporées dans les futures réseaux neuronaux.(Sierra et al. 2010)

iii. Quiescence et activation de cellules microgliales

En 1919, Pio del Rio-Hortega est le premier à introduire le terme de microglie et met notamment en exergue les différences morphologiques et fonctionnelles de ces cellules. A l'état de quiescence, la microglie présente un phénotype ramifié caractérisé par une arborisation cytoplasmique marquée **(Figure 17).**

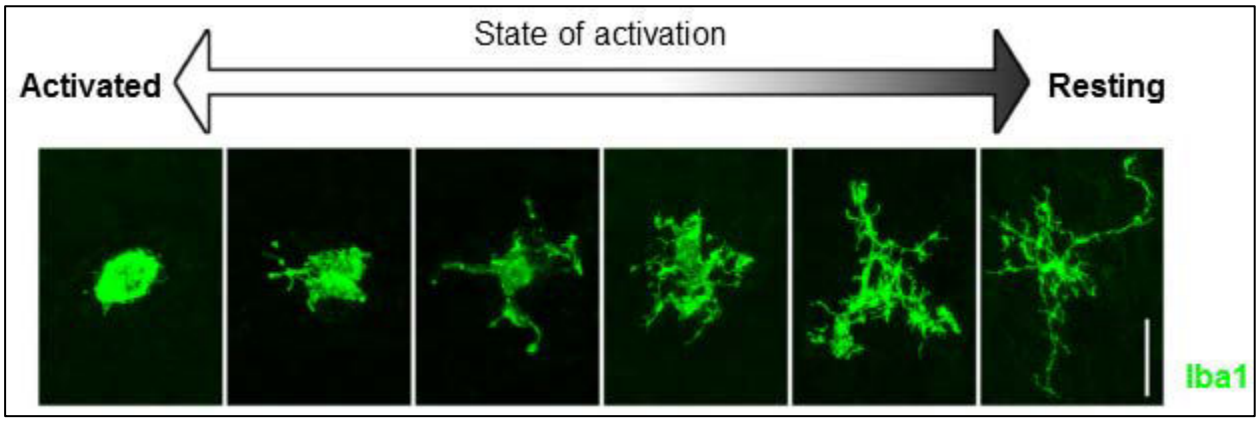


Figure 17. Morphologie des cellules microgliales en fonctions de leur état d'activation. (D'après Cunningham, 2013)

Les cellules microgliales peuvent être mises en évidence par immunohistochimie à l'aide de nombreux marqueurs tels que Iba1, (ionized calcium-binding adaptator molecule 1), CD11b ou encore F4/80 **(Tableau 5).** Cependant, ces marqueurs à eux seul ne sont pas suffisant pour distinguer ces cellules des macrophages périvasculaires et ceux dérivés de monocytes recrutés dans le cerveau en conditions inflammatoires. Chez la souris et le rat, la technique de cytométrie de flux permet d'isoler spécifiquement ces cellules, parmi les autres cellules périphériques, par l'analyse de l'expression différentielle des marqueurs CD45 et CD11b. La microglie exprime également le récepteur CX3CR1 qui, en dehors des monocytes $CCR2^{-}$ $Ly6^{Low}$, est spécifique de ces cellules (Goldmann et al. 2013).

Marqueurs	Expression par la microglie quiescente	Expression par la Microglie activée	Expression par les macrophages
Iba1	++	+++	++
CD11b	++	+++	++
F4/80	++	+++	++
CX3CR1	++	++	+/-
CD68	+/-	+++	++
CMH II	-	+++	+/-
iNOS	-	+++	+/-
CD45	+	++	+++

Tableau 5. Marqueurs protéiques des cellules microgliales et des macrophages utilisés en immunohistochimie et/ou cytométrie de flux.

- : absence d'expression protéique ; +/ : expression protéique variable ; faible expression protéique ; ++ : expression protéique modérée ; +++ : forte expression protéique.

Lors de la détection de signaux traduisant une atteinte du SNC, comme la présence de vagues calciques intracellulaires (Sieger et al. 2012) ou la libération d'adénosine triphosphate (ATP) (Davalos et al. 2005) par les cellules environnantes, les cellules microgliales migrent rapidement vers le site de la lésion et adoptent une morphologie amiboïde caractéristique de microglie activée **(Figure 17).** L'état d'activation de ces cellules entraine l'augmentation d'expression de certains marqueurs protéique, comme Iba1, CD11b et CD45, et induit également l'expression de CD68, protéine notamment exprimée au cour de la phagocytose, du CMH de type II et de l'oxyde nitrique synthase inductible iNOS.

La microglie et les macrophages sont capables de reprogrammer leurs fonctions en réponse à une lésion ou une infection et modifier leurs interactions avec les autres cellules du SI, comme les lymphocytes. Ce processus est appelé la polarisation et a été initialement décrit pour les macrophages périphériques. Ces derniers peuvent adopter plusieurs phénotypes polarisés. **(Figure 18).**

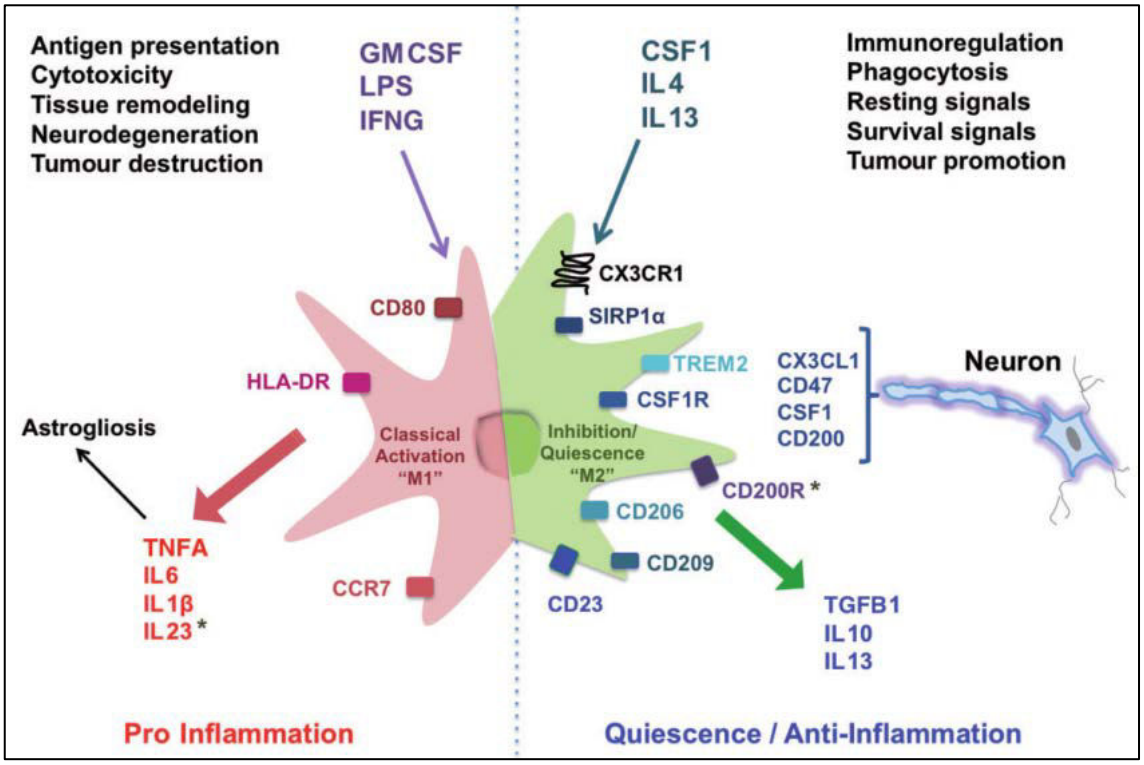


Figure 18. Phénotypes polarisées de la microglie et des macrophages. (D'après Norden, Muccigrosso, & Godbout, 2014)

Classiquement, l'état M0 traduit une absence de polarisation. Le phénotype d'activation M1 est sous la dépendance de signaux pro-inflammatoires, comme la production d'interféron-γ par les lymphocytes T-helpers (signalisation Th1), ou la libération d'IL1-β induite par l'administration de LPS ou de PolyI : C. A l'inverse, les signaux anti-inflammatoires comme la signalisation Th2 des lymphocytes, l'IL-4 et l'IL-10 ou encore le TGF-β favorisent la polarisation cellulaire en un phénotype M2**.** En particulier, la chimiokine CCL2 (MCP-1) impliquée dans l'attraction des monocytes pro-inflammatoires favorise l'établissement du phénotype M2.(Roca et al. 2009). Les cellules activée M1 expriment le CMH de classe II, la protéine iNOS et libèrent différentes chimiokines proinflammatoires comme le TNF alpha, l'IL1-Beta et l'IL-6. Les cellules M2 se caractérisent par l'expression facteurs principalement anti-inflammatoires comme l'Arginase-1, l'IL-10 et le TGF-Beta. **(Figure 18)**

A l'instar des macrophages périphériques, la microglie possède également la capacité d'adopter les phénotypes polarisés M1 et M2. Le phénotype microgliale M1 est impliqué dans de nombreuses pathologies inflammatoires du SNC. Le phénotype M2 au contraire, est connu pour exercer des effets bénéfiques sur le SNC, en favorisant la réparation du tissu lésé. (Hu et al. 2014) . De manière intéressante, les cellules microgliales semblent moins enclines à adopter le phénotype anti-inflammatoire et neuroprotecteur M2. (Durafourt et al. 2012).

Cependant, ce concept de polarisation M1/M2 est source de nombreux débats. En effet, la combinaison facteurs présents dans les tissus au cours des phénomènes inflammatoires implique une vision plus complexe de ce phénomène, qui va bien au-delà de ce paradigme binaire d'activation. (Martinez & Gordon 2014). Une étude récente considère d'ailleurs une nouvelle nomenclature qui prend en compte plusieurs sous-phénotypes d'activation. **(Tableau 6)**. La polarisation M2 a notamment été sous catégorisée en fonction la réponse à divers stimuli. (Michell-Robinson et al. 2015). Les phénotypes M2a et M2c reposent sur des signaux anti-inflammatoires, associés à la suppression de la réponse des macrophages et à une réparation tissulaire. Le phénotype M2b quant à lui peut être induit par l'administration de LPS, favorise l'expression de marqueur pro-inflammatoire par la cellule activé mais provoque paradoxalement la libération d'IL-10 par les macrophages.

Classic nomenclature	Novel nomenclature	Activating molecules	Notes	Citations
M0/Unpolarized	M(-)	None, M-CSF, *or* GM-CSF	M-CSF or GM-CSF may be used to compare with macrophages	Durafourt *et al.*, 2012
M1	M(LPS) M(IFNγ) M(LPS + IFNγ)	LPS, IFNγ or both	a.k.a. Classical activation	Mantovani *et al.*, 2004
M2	M(IL4)	IL4	a.k.a. Alternative activation	Stein *et al.*, 1992; Gordon, 2003; Sierra-Filardi *et al.*, 2010
M2a	M(IL4 + IL13)	IL4 and IL13	Profile associated with anti-inflammatory phenotype in macrophages	Taylor *et al.*, 2005; Leidi *et al.*, 2009
M2b	M(Ig + LPS)	Immune complexes and LPS	Profile associated with pro-inflammatory cell-surface protein expression but IL10 secretion in macrophages	Edwards *et al.*, 2006; Leidi *et al.*, 2009
M2c	M(IL10 + TGFβ1)	IL10 and TGFβ1	Profile associated with tissue remodelling and immune suppression in macrophages	Mantovani *et al.*, 2004; Leidi *et al.*, 2009

Tableau 6. Nouvelle nomenclature de la polarisation de la microglie et des macrophages

iv. Priming microglial et pathologies du SNC

Le *priming* microglial correspond à un état d'activation accru de la microglie, en réponse à un second stimulus inflammatoire. Par exemple, une infection systémique transitoire peut induire une activation microgliale primaire. L'exposition ultérieure et chronique à des faibles quantités d'un agent pathogène, est susceptible de provoquer une exacerbation de la réponse microgliale. Au cours de ce phénomène la microglie adopte un phénotype pro-inflammatoire responsable de dégâts tissulaires. Ce mécanisme de modulation du phénotype microglial serait fortement dépendant de la composition du microenvironnement du SNC. En cas de lésion neuronale, la perte de certains ligands permettant la maintenance de l'état de quiescence microgliale pourrait sous-tendre ce priming. Ce concept de « sensibilisation microgliale » constitue une base cellulaire et moléculaire faisant le lien, à l'instar de la notion de « *second hit* », entre une inflammation survenant au cours du développement cérébral, et l'apparition de pathologies du SNC chez l'adulte. Cette vulnérabilité de la microglie aux altérations développementales porte le nom de «microgliopathie ».

En résumé, la microglie joue un rôle primordial dans le maintien de l'homéostasie du SNC, son développement et le bon fonctionnement des réseaux neuronaux. L'altération de l'activité de ces cellules peut donc contribuer à la pathogenèse et à la progression de maladies neurologiques**.** D'autres types cellulaires, comme les astrocytes, les oligodendrocytes et les cellules endothéliales contribuent également à l'immunité innée du SNC.

b. Les astrocytes et les oligodendrocytes.

La contribution des astrocytes dans les processus neuro-immunologiques est bien plus complexe que celle de la microglie. Ces cellules ont initialement été décrites comme jouant un simple rôle nutritif et de support aux neurones. En réalité, neurones et astrocytes sont intimement connectés pour permettre le bon fonctionnement du SNC. Les principales fonctions des astrocytes incluent : la clairance et le recyclage du glutamate, neurotransmetteur potentiellement neurotoxique, le tamponnage du potassium, la régulation de la balance hydrique, et la modulation de l'activité synaptique et du flux sanguin cérébral. Les astrocytes produisent également des facteurs neurotrophiques comme le GDNF et des cytokines anti-inflammatoires comme l'IL-10 (Nash et al. 2011). Inversement, sous l'effet de signaux émanent des TLR et NLR les astrocytes participent à l'immunité innée et deviennent la principale source de production de médiateur inflammatoires incluant des composants du système du complément, les IL-1β, IL-6, et des chimiokines comme CCL2, CXCL1, CXCL10 et CXCL12. (Richa Hanamsagar1, Mark L. Hanke2, and Tammy Kielian2 2012), (Glabinski et al. 1996). Les oligodendrocytes, qui participent activement à la myélinisation des axones, sont également impliqués dans la régulation des processus immunitaires au sein du SNC, notamment par leurs interactions avec les cellules microgliales et les macrophages. (Clemente et al. 2013).

c. Les macrophages périvasculaires, des méninges et des plexus choroïdes

Les plexus choroïdes, les méninges et les espaces périvasculaires sont peuplés par des macrophages dont l'origine, la morphologie et le phénotype, sont bien distincts de la microglie. En effet ces macrophages dérivent embryologiquement de précurseurs de l'hématopoïèse définitive qui a lieu au niveau de la région de l'aorte-gonades-mesonephros (AGM) (autour de E10,5 chez la souris) et se poursuit ensuite dans le foie fœtal. En post-natal, ces cellules proviennent exclusivement de précurseurs monocytaires de la moelle osseuse (MO). Des études réalisées sur des souris et des rats avec une MO chimérique (Lambertsen et al. 2011), (Bechmann et al. 2001) ainsi que sur des primates non humain (Soulas et al. 2009) ont permis de montrer que les macrophages périvasculaires étaient régulièrement renouvelés par des cellules périphériques circulantes en provenance de la MO. Le temps de renouvellement de ces cellules n'est pas bien documenté, mais semblerait être de l'ordre de plusieurs mois.

Sur le plan morphologiques et phénotypique, ces macrophages sont très proche de la microglie activé (Guillemin & Brew 2004) et des cellules dendritiques.

2. Recrutement des cellules immunitaires périphériques dans le SNC.

Bien que le SNC soit doté de cellules immunocompétentes et capables de réagir efficacement à une agression, les cellules immunitaires périphériques présentes dans l'environnement vasculaire du tissu nerveux peuvent, sous certaines condition, pénétrer dans le parenchyme cérébral et contribuer à moduler les mécanismes neuroinflammatoires. Des travaux suggèrent de plus que l'infiltration du SNC par les cellules immunitaires périphériques joue un rôle clé dans les mécanismes de défense contre une infection et de réparation du tissu lésé. (Hauwel et al. 2005) (Chen et al. 2001)

a. Les voies d'entrées des leucocytes dans le cerveau

Les leucocytes peuvent accéder au SNC par différentes portes d'entrées **(Figure 19)** :
1) Par les capillaires non-fenêtrés de la BSL, notamment au niveau des plexus choroïdes, **2)** par l'espace vasculaire de Virchow-Robin, régions ou les artérioles profondes sont en continuité avec l'espace sub-arachnoïdien, et **3)** via les veinules post- capillaires qui pénètrent directement dans le parenchyme cérébral.

Au niveau de tous ces sites d'entrée potentielle, les cellules accèdent au tissu cérébral par extravasation et migration au travers des cellules endothéliales, et des prolongements gliaux. De plus, le degré de surveillance immunitaire périphérique est variable selon les différentes régions cérébrales (Hickey et al. 1991). En effet, les zones où la BHE est réduite, comme l'*area postrema*, ou les organes circumventriculaires comptent beaucoup plus de cellules immunitaires systémiques. Ces régions constituent également un espace de dialogue privilégié entre les macrophages cérébraux périvasculaires, et les lymphocytes T circulants, permettant l'organisation de la réponse adaptative à la présence d'un pathogène au sein du SNC.

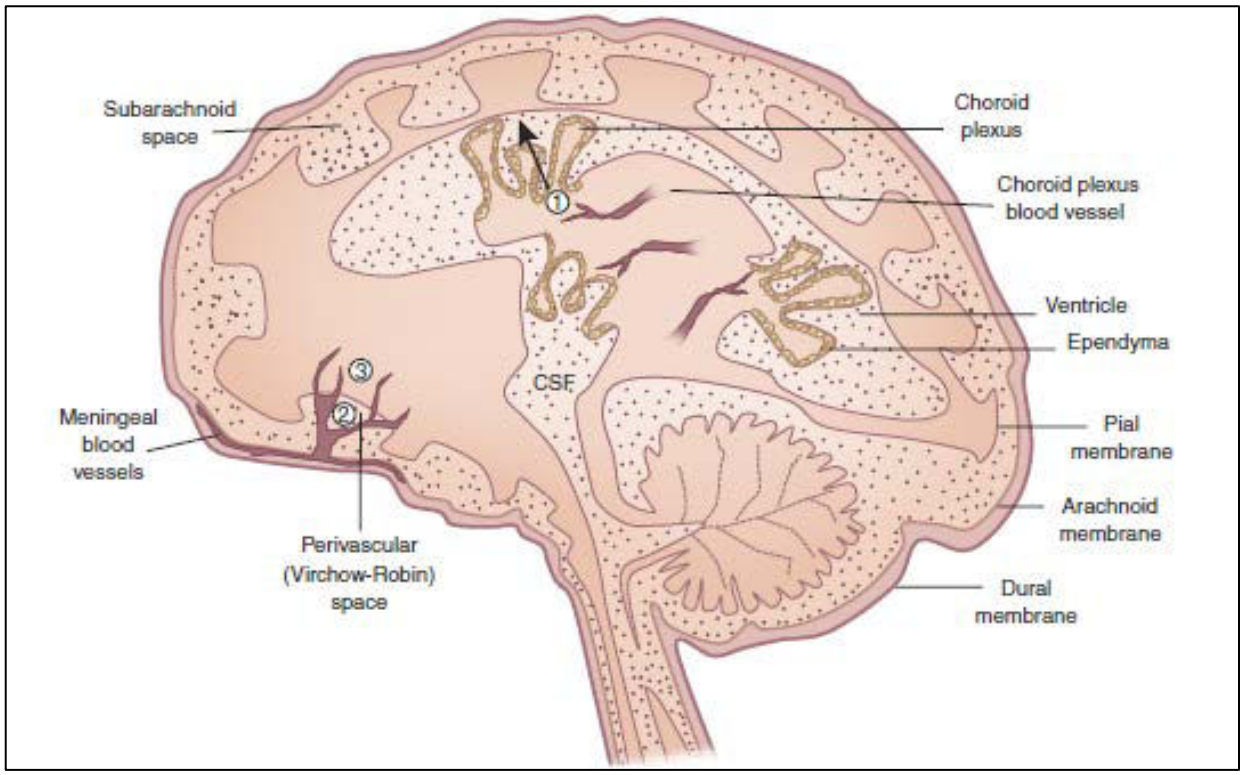


Figure 19. Site cérébraux potentiels permettant l'accès au SNC par les cellules immunitaires périphériques.(D'après Ousman & Kubes, 2012)

b. Interactions avec les lymphocytes T.

La microglie est capable d'interagir avec les lymphocytes T CD4+, afin d'orienter et de moduler la réponse inflammatoire. Ces LT CD4+ sont recrutés dans le SNC au cours de nombreuses pathologies neuroinflammatoires et leur participation est cruciale pour déterminer le phénotype d'activation microgliale et ses conséquences sur l'élimination des agents pathogènes.(González et al. 2014). Les LT CD4+ naïfs peuvent être activés par des cellules présentatrices d'antigène comme les DC et, comme les macrophages et la microglie, et sous l'influence de différents médiateurs, peuvent adopter différents phénotypes, afin d'assurer la spécificité de la réponse immunitaire à l'agression. Les phénotypes Th1 etTh17, correspondant à la différenciation des cellules T en « T helpers », sont favorisés par la présence de stimuli proinflammatoires **(Figure 20)**, comme la libération d'IL-12 par les DCs et vont favoriser la polarisation M1 de la microglie. Cependant, ce phénotype d'activation microglial est associé aux phénomènes neuroinflammatoires et aux dégâts cérébraux qui en résultent (Browne et al. 2013)

Le phénotype Th2 est lui favorisé par l'induction de cytokines anti-inflammatoires comme l'IL-4 permettant d'une part aux LT CD4+ d'acquérir des fonctions régulatrices limitant l'inflammation et d'autre part, de promouvoir le phénotype microglial M2, aux fonctions neuroprotectrices.

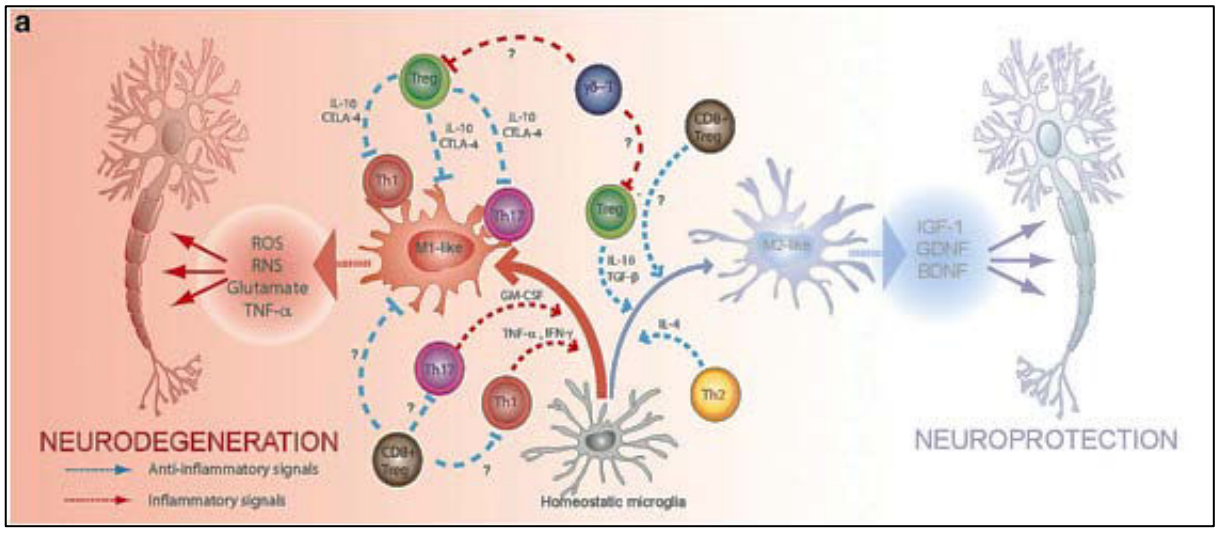


Figure 20. Dialogue entre les lymphocytes T et la microglie. (D'après González & Pacheco, 2014)

c. Les neutrophiles

Les neutrophiles sont considérés comme étant la première ligne de défense du système immunitaire périphérique contre les infections, notamment bactériennes. (Borregaard 2010), (Nathan 2006). Ces cellules, appartenant aux polynucléaires, sont rapidement mobilisées sur le lieu de l'infection en réponse à des chimiokines de la famille des CXC (Mantovani et al. 2011) et induisent une myriade de réponses anti-inflammatoires. Dans le cas de l'encéphalomyélite auto-immune expérimentale (EAE), modèle animal de la sclérose en plaque, ces cellules sont parmi les premières à pénétrer dans le SNC et leur déplétion réduit la sévérité de la pathologie. (Steinbach et al. 2013) Les neutrophiles répondent à la stimulation des PRR par le biais des TLRs et des NLRs, et sont activés par des cytokines comme le TNF-alpha et les IFN-gamma. Une fois activés, ces cellules augmentent leur expression de CD11b, molécule d'adhésion favorisant leur transcystose, et libèrent à leur tour des chimiokines impliquées dans le recrutement des lymphocytes L'influx de neutrophile dans le SNC résulterait en partie de la production de TNF-apha par les mastocytes méningés.

d. Les mastocytes

Les mastocytes sont des cellules d'origine myéloïdes de constitution granulaire qui sont connues pour leurs rôles dans la réaction allergique. Au niveau du SNC ces cellules sont particulièrement nombreuses au niveau de la moelle épinière et des méninges. Elles contribuent à la réponse inflammatoire locale au sein du parenchyme cérébral, notamment par la libération de TNF-alpha et de l'IL1-Beta et semblent exercer à la fois un rôle protecteur et offensif pour le SNC. Mais leurs rôles précis restent cependant à être clarifiés.

e. Les cellules dendritiques

Comme mentionné précédemment, les cellules dendritiques (DC) jouent un rôle majeur de l'initiation de la réponse des LT, notamment par leur rôle de présentation antigénique. Cependant, cette fonction des DC au niveau du parenchyme cérébral n'a pas été mise en évidence. Au niveau du SNC, ces cellules sont principalement retrouvées au niveau des méninges et des plexus choroïdes. Les DC peuvent être détectées dans le parenchyme cérébral en condition inflammatoire mais des travaux réalisés sur les modèles d'EAE, ont montré que ces cellules proviendraient de la différentiation des monocytes, en raison de la rupture de la BHE observée suggérant que ces cellules ont infiltré le SNC. Miller SD, McMahon EJ, Schreiner B, Bailey SL. Antigen presentation in the CNS by myeloid den- dritic cells drives progression of relapsing experi- mental autoimmune encephalomyelitis. Almolda B, Gonzalez B, Castellano B. Antigen pre- sentation in EAE: role of microglia, macrophages and dendritic cells. Front Biosci. 2011

f. Les monocytes

Les monocytes sont des leucocytes circulants issus des progéniteurs hématopoïétiques de la moelle osseuse, capables de se différentier en macrophages ou en DC au niveau des tissus. En condition d'homéostasie et d'inflammation, les monocytes quittent la circulation sanguine et migrent dans les tissus, sous l'influence de différents facteurs libérés par les cellules environnantes, comme les cytokines et les chimiokines. En fonction du statut inflammatoire, ces cellules vont ensuite adapter leur différentiation en macrophage ou DC. Les monocytes peuvent être divisés en plusieurs catégories, en fonction des récepteurs aux chimiokines exprimés et de la présence d'autres protéines de surface spécifique. **(Figure 21).**

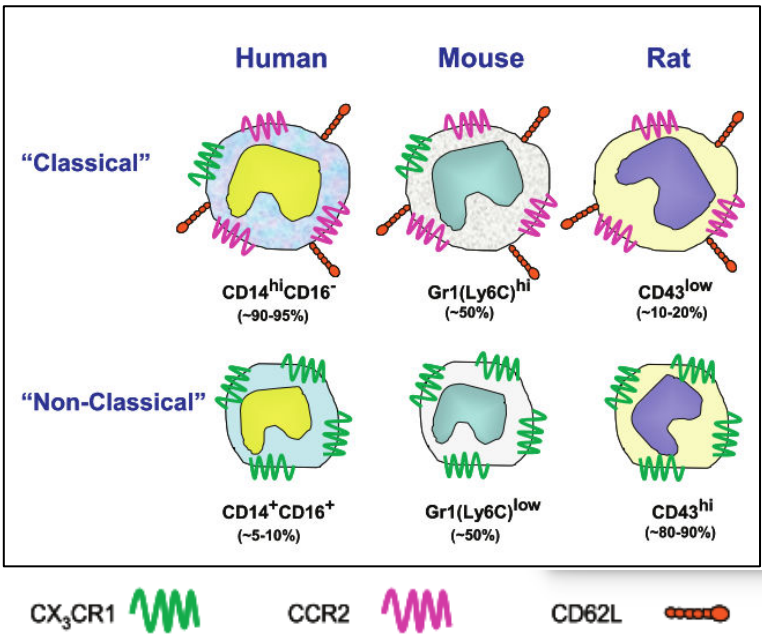


Figure 21. Représentation schématiques des principales populations de monocytes chez l'humain la souris et le rat. (D'après Strauss-Ayali, Conrad, & Mosser, 2007)

Chez l'humain, les monocytes pro-inflammatoire, exprimant des taux élevés de CD14 et positifs pour CCR2 sont les plus représentés. Chez la souris, il existe un équilibre entre monocytes pro-inflammatoires Ly6C^{hi} CCR2+ et monocytes circulants Ly6C^{lo} CCR2-. Chez le rat cependant, la population monocytaire majoritaire est représentée par les monocytes circulant caractérisés par une forte expression du marqueur CD43 et l'absence de CCR2. Les monocytes pro-inflammatoires (CD43^{lo}) représentent moins de 20% de la population monocytaire. Tous les monocytes au phénotype classique pro-inflammatoire sont équipé de la L-Selectine CD62L permettant la transmigration de ces cellules.

i. Recrutement des monocytes aux sites d'infection

Le recrutement de monocytes au sein du SNC est un mécanisme essentiel pour le contrôle et l'élimination d'une infection virale. Néanmoins, ces cellules peuvent aussi participer à la pathogenèse de maladies neuroinflammatoires. Les monocytes proinflammatoires (Ly6C^{hi}) et exprimant fortement le récepteur CCR2 constituent la majeure partie de la population monocytaire chez la souris et l'homme et sont principalement recrutés au sein du SNC via la chimiokine CCL2. Celle-ci est libérée au niveau du SNC, notamment par les astrocytes et les cellules endothéliales, en réponse à une infection. Une autre catégorie moins représentée de monocytes, expriment faiblement CCR2, mais des taux élevés de CX3CR1.

Ces monocytes Ly6C^{low}, sont considérés comme des monocytes « patrouilleurs » et sont majoritairement impliqués dans des processus anti-inflammatoire et de réparation tissulaire (Shi & Pamer 2011).

ii. Les monocytes se différencient en microglie/macrophages ou en cellules dendritiques au sein du cerveau infecté.

Dans les modèles de pathologies neuroinflammatoires, comme l'EAE, il a été montré que les monocytes Ly6C hi pouvaient se différentier en macrophages et en DC au phénotype pro-inflammatoire M1. De façon similaire dans les modèles d'infection virale du SNC, ces monocytes Ly6C ^{hi} donneraient naissance à des macrophages pro-inflammatoires de phénotype M1, exprimant des niveaux élevés de CD45 (CD45^{hi}), et de CD11c pour les DC. Ces populations cellulaires expriment également de fort de taux d'oxyde nitrique (NO) et de TNF alpha au cours de nombreuses infections virales. (Terry et al. 2012). De plus, ces cellules sont également compétentes pour présenter des antigènes et stimuler la prolifération des cellules T (Terry et al. 2012).

Au cours des infections cérébrales, les monocytes serviraient également de précurseurs à la microglie. A titre d'exemple, au cours des encéphalites causées par le VNO chez la souris, les monocytes recrutés en réponse à l'infection du SNC peuvent se différentier en macrophages CD45high mais également en population exprimant des taux intermédiaires de CD45 (CD45^{int}), caractéristique de la microglie activée. Cependant, ces cellules issues de la périphérie sont phénotypiquement non distinguables de la microglie activée, sauf concernant l'expression du marqueur Ly6C, permettant d'attester de l'origine monocytaire de ces cellules. (Getts et al. 2008). L'étude des animaux chimériques possédant les cellules de la moelle osseuse marquées couplé à des expériences de transfert adoptif a de plus montré l'absence de rupture de la BHE au cours de l'infection par le VNO, attestant que l'infiltration monocytaire se déroule indépendamment de la rupture de cette barrière. En outre, le recrutement de ces monocytes Ly6C proinflammatoires contribuerait à la pathogenèse de ces encéphalites induites par le VNO, car le bloquage de la chimiokine CCL2 réduit significativement l'infiltration monocytaire et prolonge la survie des animaux. Cependant, le rôle joué par les cellules microgliales activées dérivées de l'infiltrat monocytaire reste à déterminer.

3. Organisation de la réponse immunitaire à l'infection par le CMV dans le cerveau en développement.

L'infection par le CMV du cerveau en développement induit une réponse inflammatoire particulièrement robuste, caractérisée par : **1)** le recrutement et l'activation de cellules résidentes, **2)** l'infiltration de cellules immunitaires périphériques **3)** l'induction d'un nombre important de chimiokines proinflammatoires et de gènes notamment régulés par les interférons. Cependant, tous ces phénomènes doivent encore être confirmés en particulier au cours des infections cérébrales *in utero*.

Dans cette dernière partie, j'aborderai les caractéristiques neuro-immunologiques de l'infection par le CMV, spécifiquement au cours du développement cérébral, à partir des travaux réalisés sur le modèle murin d'infection par le MCMV.

a. Réponse précoce à l'infection cérébrale : rôle joué par l'immunité innée du SNC

i. Rôles des interférons

De nombreuses études ont pu mettre en évidence le rôle joué par les interférons dans la limitation de l'infection périphérique par le CMV. Dans le cerveau, des récepteurs fonctionnels aux IFN sont exprimés à différents niveaux par les cellules et une action de ces IFN a été décrite sur la microglie, les astrocytes et les neurones. Ce système de l'immunité intrinsèque représente la première ligne de front contre les infections virales, capable de retarder la réplication du virus, et organiser la réponse de l'immunité adaptative systémique. Dans le cerveau embryonnaire et néonatal, l'injection intracrânienne de MCMV induit une forte expression de gènes induits par les IFN en particulier dans les neurones. Cependant, l'expression de ces gènes dans le cerveau de souris en développement est associée à une réponse antivirale 10 à 100 fois plus faible que dans le cerveau adulte. D'après les auteurs, cet effet pourrait résider dans l'absence d'expression par les cellules immatures, de gènes nécessaires à l'inhibition de la réplication du MCMV, ou être le résultat d'une charge virale initialement trop importante limitant ainsi l'effet antiviral. En outre, l'apport exogène d'IFN est efficace pour réduire l'infection. (van den Pol et al. 2007)

ii. Réponse des astrocytes à l'infection

Les astrocytes sont capables de répondre rapidement à l'infection par le CMV du cerveau en développement, par le biais d'un réseau hautement régulé de cytokines et chimiokine permettant d'orchestrer la réponse immunitaire. Comme je l'ai précédemment abordé, les approches *in vitro* réalisées dans les années 2000 ont démontré le fort tropisme du virus pour les astrocytes. (Lokensgard et al, 1999).De plus, les travaux de Cheeran et al ont mis en évidence, sur des cultures purifiées d'astrocytes humain, que les chimiokine pro-inflammatoires TNF-alpha, IL-1 Beta ainsi que l'IFN gamma, inhibaient la réplication virale au sein de ces cellules. Cependant, une étude ultérieure a dévoilé que les astrocytes ne produisaient pas ces molécules au cours de l'infection par le CMV *in vitro*. En revanche, ces cellules libèreraient la chimiokine CCL2 (MCP-1) impliquée dans l'attraction des monocytes (Crane et al. 2009), et l'interleukine IL-8, associée au recrutement des neutrophiles. (Aloisi et al. 1992), (Hammond et al. 1995). De plus, les chimiokines CCL2, CXCL8, CCL3 et CCL5 produites par les astrocytes induiraient également la migration des cellules microgliales sur le site de l'infection. (Cheeran et al. 2001), (Cheeran et al. 2003).

iii. Réponse microgliale à l'infection

La réponse microgliale à l'infection par le CMV a principalement été étudiée *in vitro* et peu de données sont disponibles concernant le rôle joué par ces cellules, notamment au cours des infections cérébrales *in utero* par le CMV. Comme je l'ai évoqué dans le chapitre II, le tropisme viral *in vivo* du CMV pour la microglie n'est pas clairement défini car ces cellules seraient réfractaires à une infection productive et ne présenteraient pas d'effet cytopathique.(Maxim C-J Cheeran et al., 2009) En outre, contrairement aux astrocytes, ces cellules produisent des médiateurs pro-inflammatoires impliqués dans la suppression de la réplication virale. (Cheeran et al. 2001).

En effet, l'activation microgliale conduit à la libération de TNF-alpha, d'IL-6 et de chimiokines comme CXCL10 et CCL2. CXCL10 a un effet chimiotactique pour les lymphocytes T et les Natural Killers cellules qui jouent un rôle majeur dans l'inhibition de la réplication virale via les IFN gamma.(Cheeran et al. 2000) et la destruction des cellules infectées.
Cette signalisation médiée par les IFN-gamma est étroitement régulée par l'IL-10 molécule libérée par les lymphocytes Th1 .

Cette cytokine aux vertus anti-inflammatoire a notamment pour rôle d'inhiber la libération par la microglie de CXCL10 et des médiateurs pro-inflammatoires afin de limiter les dégâts tissulaires mais s'oppose aussi au rôle antiviral médié par ces cellules. En outre, l'absence de cette interleukine dans les modèles murins KO, conduit à une régulation altérée de la réponse aux IFN gamma et rend l'infection par le MCMV létale. (Cheeran et al. 2007). De manière intéressante le HCMV possède une chimiokine homologue de l'IL-10 cellulaire capable d'inhiber la production de CXCL10 par les cellules microgliales avec pour conséquence, une inhibition du recrutement de lymphocytes. Cet analogue viral de l'IL-10 démontre un des mécanismes utilisé par le HCMV pour altérer la réponse antivirale de la microglie.

Dans les modèles *in vivo* d'infection cérébrale par le CMV, le rôle de ces cellules a été principalement objectivé chez des animaux adultes. En particulier, une étude récente suggère le rôle potentiellement délétère des cellules microgliales dans la pathogenèse de l'infection du cerveau fœtal, en particulier, leur recrutement aberrant en réponse à l'infection par le MCMV et leur implication de l'apparition d'anomalies de la corticogenèse.

iv. Rôles des neutrophiles, des monocytes et des NK

La réponse immunitaire précoce au CMV dans le cerveau en développement est caractérisée par l'afflux de cellules de l'immunité innée, comme les neutrophiles, les monocytes/macrophages/DC et les NK. Dans les modèles murins d'infection néonatale, les cellules immunitaires infiltrantes sont définies par leur fort taux d'expression de CD45 (CD45 ^{high}) et leur expression relative de CD11b. Comme je l'ai précédemment évoqué, les neutrophiles répondent rapidement à une attaque de pathogènes comme les virus et les bactéries, et contribuent à leur élimination. Cependant, l'infection par le MCMV des animaux déficients pour l'IL-10 est associée au recrutement excessif de neutrophiles dans le cerveau. En particulier, l'infection induit une expression démesurée de CXCL2, chimiokine impliquée dans l'attraction des granulocytes, notamment des neutrophiles et des mastocytes, et semblerait être à l'origine de cette infiltration pathologique. De plus, le blocage *in vivo* de CXCL2 améliore également la survie des animaux infectés. (Mutnal et al. 2010).

Le rôle joué par les monocytes au cours des infections cérébrales par le CMV a été peu exploré, en particulier au cours du développement du SNC. Dans les modèles d'étude des infections périphériques, il a été montré que le virus pouvait jouer sur la signalisation CCL2/CCR2 afin de diriger le recrutement de monocytes. (Stern & Slobedman 2008), (Crane et al. 2009).

De plus, en raison du tropisme élevé du CMV pour les cellules de la lignée myéloïde, la mise en jeu de ce recrutement est un des mécanismes suspecté dans la stratégie de dissémination du virus. L'infection des cellules endothéliales par le HCMV a également été associée au recrutement des monocytes périphériques, à leur transcytose et leur migration au sein du tissu. (Bentz et al. 2006).

Ces résultats suggèrent que les monocytes pourraient donc être les vecteurs hématogènes du CMV, permettant son passage au travers de la BHE. Cependant, aucune étude ne fait état du rôle joué par ces cellules et de leur devenir au sein du cerveau en développement.

Le HCMV est connu pour favoriser la différentiation des monocytes en macrophages, notamment via la régulation temporelle de la caspase-3. (Chan et al. 2012) De plus, ces macrophages auraient la signature transcriptionnelle du phénotype polarisé M1, traduisant un rôle pro-inflammatoire délétère pour le tissu. (Chan et al. 2008). Néanmoins ce phénomène n'a pas été mis en évidence au niveau du SNC, et la transformation de ces cellules en microglie activée, à l'instar des encéphalites causées par le VNO, n'a pas été mise en évidence.

Les cellules NK jouent au rôle majeur au cours de l'infection des organes périphériques et leur intervention au niveau du SNC a récemment été explorée. En effet, la réponse à l'infection médiée par ces cellules semble largement dominer celle des autres partenaires de l'immunité innée, en particulier au cours de la première semaine post-natale. **(Figure 22).** En effet, dans un modèle récent d'administration du virus en néonatal, il a été montré que cette population composait environ 20% de tous les leucocytes (CD45 high) présents à P8, dans le cerveau des animaux infectés par le MCMV. Cependant, la proportion de ces cellules décroit rapidement, pour être remplacée par d'autres cellules infiltrantes, notamment de l'immunité adaptative comme les LT CD4+ et CD8+. Le rôle joué par les NK doit encore être précisé.

b. Rôle de l'immunité adaptative

L'immunité innée représente un paramètre clé de la réponse à l'infection cérébrale par le MCMV. Néanmoins, un certain nombre d'études ont mis en évidence le rôle indispensable joué par l'immunité adaptative dans l'élimination du virus dans le cerveau en développement, notamment dans les modèles murins d'infection néonatale.

i. Rôles des lymphocytes T CD8+

Les lymphocytes T CD8+, également appelée cytotoxiques en raison de leur capacité à éliminer une cellule cible, jouent un rôle primordial dans l'éradication de l'infection du SNC, et conditionne la létalité de cette dernière. En effet, en réponse à la dissémination du MCMV dans le cerveau des souriceaux, ces cellules sont recrutées dans le SNC et deviennent rapidement la population majeure parmi les CD45 high. Le recrutement de ces cellules est sous la dépendance de l'interleukine IL-10, dont l'invalidation du gène chez la souris infectée par le MCMV est associée à une forte réduction de l'infiltration lymphocytaire (et des NK). Le pic d'infiltration des LT CD8+ est relativement tardif puisqu'il survient autour du 18ème jour postnatal mais à ce stade, ces LT CD8+ représentent 70% de la population de mononucléaires périphériques ayant infiltré le SNC. L'augmentation de ces cellules au sein du SNC est également corrélée à la rapide décroissance du titre viral, indiquant l'intervention de ces LT dans la résolution de l'infection. **(Figure 22).** Dès que la charge virale atteint un minimum, le recrutement lymphocytaire s'arrête. Cependant, une étude a montré que ces cellules persistaient dans le cerveau, longtemps après l'élimination de l'infection. (Bantug et al. 2008), (Mutnal, Hu, et al. 2011)).

Les lymphocytes qui infiltrent le cerveau en développement présentent un phénotype de LT effecteurs à mémoire. Cette propriété fait intervenir les LT dans la réponse secondaire contre un antigène déjà rencontré auparavant, ce qui permet une intervention rapide et adaptée de ces cellules. Ce phénotype est notamment caractérisé par l'augmentation d'expression de CD44, un marqueur traduisant l'état « expérimenté » des LT mémoires, et la perte d'expression de CD62L, une L-selectin impliquée dans l'adhérence intercellulaire, et qui est down-régulée au cours de l'extravasation des LT dans les tissus. De plus, ces cellules T infiltrantes expriment également des marqueurs d'activation comme CD69 et CD49, qui sont up-régulés lorsque ces cellules sont hautement activées.(Bantug et al. 2008). Les lymphocytes T utilisent différentes fonctions antivirales pour contrôler l'infection au sein d'un organe, et il semblerait que la stratégie adoptée par ces cellules soit dépendante du tissu dans lequel elles résident. (Zhou et al. 2004). Dans le cas de l'infection cérébrale par le MCMV, il a été montré que les LT CD8+ contrôlaient l'infection via un mécanisme mettant en jeu les perforines, (M. C.-J. Cheeran et al. 2005) protéines aux facultés cytolytiques sécrétées par les lymphocytes et le NK au cours d'un phénomène appelé la dégranulation. Les LT CD8+ isolé à partir de cerveau infectés par le MCMV produisent de l'IFN –gamma et du TNF-alpha en présence de peptides viraux.

Cependant, une proportion non négligeable de ces cellules T CD8+ sécrétrices d'IFN-gamma ne possède pas la capacité de dégranulation et sont dans l'impossibilité d'effectuer la cytolyse. (Bantug et al. 2008). Ces données suggèrent le rôle potentiel de mécanismes non cytolytiques médiés par ces cellules et pourraient intervenir au niveau de tissus possédant de faibles capacités de régénération.

Par ailleurs, étant donné le large tropisme du CMV au niveau du SNC, il est possible que le processus d'élimination par les LT CD8+ des cellules infectées repose sur différentes fonctions antivirales effectrices, étroitement dépendantes du type cellulaire. En tout état de cause, les expériences de transfert adoptif de LT CD8+ chez des souris nouveau-nées immuno-déplétées et infectées par le MCMV ont permis de confirmer le rôle joué par ces cellules recrutées dans le SNC pour limiter la réplication du virus.

ii. Rôles de lymphocytes T CD4+

Contrairement à la réponse des LT CD8+, qui évolue proportionnellement à la charge virale, la réponse des LT CD4+ reste relativement constante tout au long de l'infection et devient rapidement submergée sur le plan quantitatif, par les LT CD8+. **(Figure 22).** De plus, le transfert adoptif de ces cellules n'a pas d'effet protecteur contre l'infection du SNC par le MCMV. Bien qu'il ne semble pas exister de corrélation directe entre la réponse des LT CD4+ et la charge virale au sein des cerveaux néonataux des souris infectées par le MCMV, les LT CD4+ contribuent néanmoins à endiguer l'infection, en fournissant au LT CD8+, des fonctions indispensables pour la reconnaissance et l'élimination de l'infection virale cérébrale. (Graham et al. 2014)

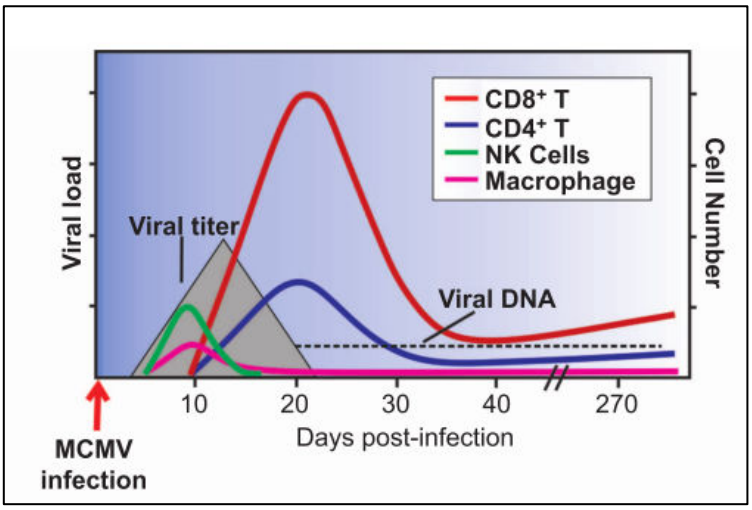


Figure 22. Evolution de la cinétique cellulaire d'infiltration dans le cerveau infecté par le MCMV. (D'après Slavuljica et al., 2014)

iii. Rôles des lymphocytes B

Les lymphocytes B sont les représentants de l'immunité humorale et ont pour fonction de fabriquer des immunoglobulines appelées anticorps, qui sont spécifiques d'un organisme pathogène. L'accumulation de cellules B spécifique s d'un virus au sein du SNC est la signature de nombreuses infections virales neurotropes. En particulier un sous-groupe de LB, les Régulateurs, (Bregs) sont impliqués dans la modulation de la réponse immunitaire, notamment en augmentant la prolifération de LT et en induisant l'activation de la microglie, au niveau des cerveaux infectés. (Mutnal et al. 2014). Dans un modèle d'infection intracérébrale par le MCMV, il a été montré que le recrutement des LB s'opérait tout au long de l'infection. De plus, cette attraction depuis la périphérie serait dépendante des chimiokine et des cytokines générées par les cellules T infiltrantes comme l'IL-1 et les facteurs trophiques APRIL et BAFF. (Mutnal et al. 2012).

Conclusion du chapitre III

En dépit de nombreuses avancées ayant permis de déchiffrer certains des mécanismes neuroimmunologiques, à la fois cellulaires et moléculaires, mis en jeu au cours des infections cérébrales par le CMV **(Figure 23),** la physiopathologique de ces infections demeure très spéculative, en particulier au cours du développement cérébral *in utero*.

En effet, la grande majorité des études réalisées sur le modèle murin ont ciblé la période postnatale, à la fois sur le plan de l'inoculation du virus, mais aussi dans le cadre de l'exploration des conséquences neuroinflammatoires. De surcroît, ces études ne tiennent pas compte d'une part des événements immunitaires précoces survenant au cours de la vie fœtale, et d'autre part, de l'étape critique de la période périnatale, en particulier de la naissance. De plus, les rôles embryonnaires précoces joués par les cellules microgliales et les cellules périphériques recrutées en réponse à l'infection cérébrale *in utero* méritent d'être explorés plus en profondeur, en raison des conséquences pathologiques à la fois morphologiques mais également cliniques, que ces cellules, ou l'altération des processus qu'elles sous-tendent peuvent engendrer.

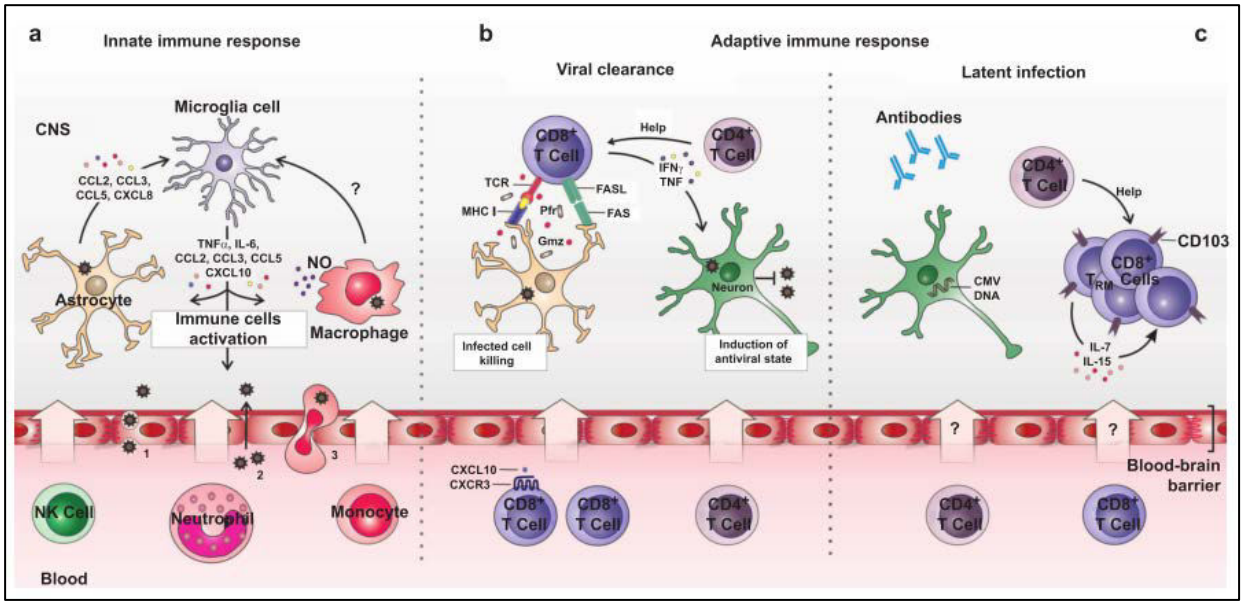


Figure 23. Schéma bilan de l'organisation de la réponse immunitaire cérébrale à une infection néonatale par le MCMV et son évolution postnatale**.** (D'après Slavuljica et al., 2014)

A. Mécanismes possibles par lesquels le MCMV pénètre dans le SNC, notamment par **(1)** l'infection des cellules endothéliales de la BHE et dissémination basolatérale des virions, ou **(2)** grâce à la rupture des jonctions serrées entre les cellules endothéliales et épithéliales, ou par la technique de « Cheval de Troie », en infectant et en utilisant les monocytes circulants comme vecteurs de transport au travers de la BHE. Une fois que le virus se retrouve dans le SNC, il peut infecter différents types cellulaires, en particulier les progéniteurs neuraux et les astrocytes. L'infection induit l'expression de nombreuses chimiokines et cytokines pro-inflammatoires responsables de l'activation microgliale et du recrutement de cellules périphériques dans le SNC. Les neutrophiles, les NK et les monocytes sont les premières cellules recrutées dans le cerveau, et ont pour rôle d'initier les processus d'élimination du virus avant l'intervention des cellules de l'immunité adaptative. A l'instar d'autres modèles d'infection virale cérébrale, les monocytes recrutés depuis la périphérie pourraient très probablement se différentier en macrophages ou en microglie activée au sein du parenchyme cérébral. Cependant, ce mécanisme n'a pas été mis en évidence au cours de l'infection à CMV, et en particulier au cours du développement du SNC. **B.** Après quelques jours d'infection, les composants de l'immunité adaptative interviennent. Les lymphocytes T CD4+ et CD8+ migrent dans le SNC , notamment sous l'effet de la chimiokine CXCL12, qui favorise le recrutement de ces cellules T en se fixant sur les récepteurs CXCR3 présents à leur surface. Les LT CD8+ jouent un rôle critique dans l'élimination des cellules infectées et dans le blocage de la réplication virale. Des mécanismes cytolytiques, mettant notamment en jeu les perforines seraient important pour la suppression des cellules non neuronales infectées. Au contraire, un système non-cytolytique prédominerait pour les neurones infectés. Les interférons-gamma libérés par les cellules T CD8 activées sont inhibent la réplication virale mais n'élimine pas l'ADN viral de la cellule précédemment infectée. Le rôle antiviral direct joué par les cellules T CD4+ au cours de l'infection virale cérébrale, en particulier aux stades développementaux précoces n'est pour l'instant pas clair. En outre, ces cellules jouent un rôle majeur dans la maintenance, la survie et la fonction des cellules T CD8+. **C.** Les lymphocytes T CD8+ persistent dans le cerveau en dépit de la résolution de l'infection, et en l'absence de virus détectable. Le rôle joué par ces cellules n'est pour l'instant pas connu mais pourraient constituer un pool de maintenance de LT au sein du SNC, capables de réagir rapidement, si l'infection se représente.

IV) Objectifs du travail de thèse.

En dépit des modèles notamment murins précédemment développés, les mécanismes physiopathologiques à l'origine de troubles neurologiques et sensoriels associées aux infections congénitales par le CMV restent mal compris. Des études récentes suggèrent l'implication de processus immunopathologiques, potentiellement responsables de dégâts indirects ayant une composante neuroinflammatoire. Cependant, la réponse immunitaire du cerveau, en particulier fœtale est mal connue.

Durant ma thèse, je me suis principalement intéressé au rôle joué par la microglie et les macrophages au cours de ces infections. Plus précisément, mon travail de thèse s'est articulé autour de trois objectifs principaux :

1. **Mettre au point un modèle animal d'infection par le CMV du cerveau de rat au cours du développement *in utero*.**

Dans ce nouveau modèle d'infection par le RCMV, le virus est inoculé par voie intracérébroventriculaire au quinzième jour de la vie intra-utérine (E15). Bien que ce mode d'administration soit particulièrement éloigné de la transmission materno-fœtale naturelle du virus, il présente l'avantage de cibler spécifiquement le cerveau embryonnaire, en s'affranchissant de la réponse immunitaire systémique maternelle et de la barrière placentaire, qui d'ailleurs s'oppose à la transmission verticale du virus chez le rat. Ce modèle nous permet donc d'étudier la réaction du système immunitaire cérébral au RCMV et la contribution des cellules immunitaires en provenance de la périphérie de l'embryon.

2. **Caractériser ce modèle animal à différents niveaux :**

- Sur le plan de la dissémination cérébrale du virus au cours du développement *in utero* et de la période périnatale, plus particulièrement en identifiant les régions cérébrales concernées et les différents types cellulaires infectés.
- Sur le plan des conséquences neuro-immunologiques précoces mises en jeu, à la fois cellulaires et moléculaires
- Sur le plan des paramètres postnataux tels que la survie, le développement staturo-pondéral, et de la présence de manifestations cliniques telles que l'épilepsie, la paralysie cérébrale et la surdité.

3. **Agir spécifiquement sur la microglie et les macrophages pour comprendre le rôle joué par ces cellules :**

- dans la réponse immunitaire cérébrale à l'infection et le contrôle de la dissémination virale.
- dans l'émergence des phénotypes cliniques postnataux

RESULTATS

I) ARTICLE 1

Cytomegalovirus prominently targets immune cells and promotes early microglial activation in the rat developing brain

Robin Cloarec et al.

Plos one (Soumis)

1. Contexte et but de l'étude

La mise au point et la caractérisation de ce nouveau modèle d'infection par le RCMV au cours du développement cérébral *in utero*, a fait l'objet de ce premier article.
Le choix de développer notre modèle chez le rat a été motivé par des aspects scientifiques et pratiques. En effet, dans le cadre de l'étude des rapports entre pathologies cérébrales et développement du cerveau, mon équipe a initialement utilisé le rat comme modèle expérimental et a notamment démontré le rôle de la protéine Srpx2 dans la migration des neurones corticaux (Salmi et al. 2013) (Article en Annexe). Notre but initial était de comprendre l'implication du CMV dans les pathologies neurodéveloppementales et en particulier celles sous-tendues par des altérations de la migration neuronale. Comme nous le verrons, nos travaux, initialement focalisés sur la possible infection de cellules souches neurales et sur la présence de défauts de la lamination corticale, se sont rapidement orientés vers des aspects immunologiques du modèle développé, même si des anomalies de la lamination corticale très localisées sont probables dans le modèle. Sur le plan pratique, nous avions de plus en notre possession un certain nombre d'outils et de techniques expérimentales déjà validées chez le rat, ce qui a tout naturellement orienté notre choix initial du modèle animal utilisé pour cette étude.

2. Approches expérimentales

Dans un premier temps, ce modèle a été mis au point par l'administration d'une souche purifiée et recombinante (GFP) de RCMV, par voie intracérébroventriculaire dans le cerveau embryonnaire de rat à E15.

Dans un deuxième temps ont été étudiées, au cours des périodes fœtales et périnatales, la dynamique temporo-spatiale de l'infection, les principaux types cellulaires infectés et les conséquences neuroimmunologiques, par des approches d'immunohistochimie, de qRT-PCR et de cytométrie de flux.

3. Principaux résultats

Notre étude a permis mettre en évidence l'émergence de processus neuro-immunologiques mis en jeu dès les stades embryonnaires et qui semblent jouer un rôle clé dans la pathogenèse de l'infection.

En particulier, le RCMV infecte en grande majorité des cellules de la lignée myéloïde exprimant le marqueur Iba-1. Le signal viral GFP préférentiellement retrouvé dans les régions periventriculaires est associé à une activation microgliale et macrophagique locale, caractérisée par une morphologie amiboïde des cellules Iba1+ et la présence du marqueur lysosomal CD68 (ED1).

Les analyses réalisées en cytométrie de flux ont de plus révélées un recrutement de cellules immunitaires périphériques dès E17 soit 2 jours après l'infection, notamment de monocytes pro-inflammatoires CCR2+, de cellules dendritiques, de lymphocytes B, de cellules nonB-nonT et potentiellement de Natural Killers. Au stade P1, soit 8 jours après l'infection, la réponse immunitaire cérébrale est dominée par les lymphocytes T et l'activation microgliale.

Dans ce modèle, l'identification de ces événements neuroimmunologiques précoces constitue un atout majeur pour la compréhension de la physiopathologie de ces infections mais leurs rôles dans la dissémination virale et l'émergence de troubles neurodéveloppementaux restent encore à déterminer

Cytomegalovirus prominently targets immune cells and promotes early microglial activation in the rat developing brain

Robin Cloarec[1,2,3], Sylvian Bauer [1,2,3], Hervé Luche[4,5,6], Emmanuelle Buhler[1,2,3,7], Emilie Pallesi-Pocachard[1,2,3,8], Manal Salmi[1,2,3], Sandra Courtens[1,2,3], Annick Massacrier[1,2,3], Pierre Grenot[4,6], Natacha Teissier[9,10,11], Françoise Watrin[1,2,3], Fabienne Schaller[1,2,3,7], Homa Adle-Biassette[9,10,11], Pierre Gressens[9,10,11], Marie Malissen[4,5,6], Thomas Stamminger[12], Daniel N. Streblow[13], Nadine Bruneau[1,2,3]¶, Pierre Szepetowski[1,2,3]¶

[1]INSERM U901, Marseille, France.

[2]Mediterranean Institute of Neurobiology (INMED), Marseille, France.

[3]UMR_S901, Aix-Marseille University, Marseille, France.

[4]CIPHE (Centre d'Immunophénomique), PHENOMIN, UM2 Aix-Marseille University, Marseille, France.

[5]INSERM US012, Marseille, France.

[6]CNRS UMS3367, Marseille, France.

[7]PPGI platform, INMED, Marseille, France.

[8]PBMC platform, INMED, Marseille, France.

[9]INSERM, U1141, Paris, France.

[10]Paris Diderot University, Sorbonne Paris Cité, Paris, France.

[11]PremUP, Paris, France.

[12]Institute for Clinical and Molecular Virology, University of Erlangen-Nuremberg, Erlangen, Germany.

[13]Vaccine & Gene Therapy Institute, Oregon Health and Science University, Portland, OR, USA.

* Corresponding authors: e-mails: nadine.bruneau@inserm.fr or pierre.szepetowski@inserm.fr

Abstract

Congenital cytomegalovirus infections are the leading cause of neurodevelopmental disorders in human and represent a major health care and socio-economical burden. In contrast with this medical importance, the pathophysiological events associated with brain cytomegalovirus infection remain poorly known. Murine models of brain cytomegalovirus infection, mostly neonatal, have brought recent insights into the possible pathogenesis, with convergent evidence for the alteration and for the possible involvement of brain immune cells. Alternative models in other species, which would take into account *in utero* events, are still needed to confirm and expand those findings, particularly concerning the early developmental stages following infection of the fetal brain. We have created a novel model of *in utero* cytomegalovirus infection in the developing rat brain. Rat cytomegalovirus was injected intraventricularly at embryonic day 15 and the brains analyzed using a combination of gene expression analysis, immunohistochemistry and multicolor flow cytometry experiments. Rat cytomegalovirus infection was prominently detected in $CD45^{low/int}$, $CD11b^{+}$ immune cells corresponding to microglial cells, in $CD45^{high}$, $CD11b^{+}$ cells (myeloid lineage cells including macrophages), and in $CD45^{+}$, $CD11b^{-}$ cells (lymphocytes and non-B non-T cells). Rat cytomegalovirus infection of the developing rat brain rapidly triggered a cascade of events comprising chemokine dysexpression, infiltration by peripheral immune cells (myelomonocytes and lymphocytes), and local microglial activation at the sites of infection. In line with previous findings in neonatal murine models and in human specimen, our study further suggests that the aforementioned pathophysiological events might play critical roles in the early stages following brain cytomegalovirus infection *in utero*. Further studies are now needed in order to determine which role, whether favorable or detrimental, those putative double-edge swords events actually play in the pathogenesis of congenital cytomegalovirus infection of the brain.

Key words: cytomegalovirus; congenital infection; fetal brain; microglia; macrophage; lymphocyte; rat.

Introduction

Congenital cytomegalovirus (CMV) infections are the leading cause of human neurodevelopmental disorders, with an incidence of about 1% of all live births [1]. Upon maternal infection, CMV can cross the placental barrier and reach the fetus. Overall 5-10% of infected neonates show severe neurological and other defects at birth (*e.g.* growth retardation, microcephaly) and another 10% will develop severe neurological diseases (*e.g.* hearing loss, cerebral palsy, epileptic seizures, intellectual disability). Also, in the remaining 80-85% the long-term consequences are unknown; the possible influence on various brain disorders such as autism, schizophrenia or epilepsy has been postulated but remains elusive. The severity and the somehow unpredictable outcome of such congenital infections, the difficulties in generating a CMV vaccine [2] and generally the current lack of an effective preventive strategy, the limited efficacy of antiviral neonatal treatment on the severe deficits, are in contrast with the relative paucity in the number of studies actually aiming at deciphering the mechanisms of such brain infections, particularly *in utero* - hence the long-lasting lack of a clear understanding of the underlying pathophysiological processes [3]. Having better knowledge on the pathophysiological mechanisms of congenital CMV infection yet represents a health care and socio-economical priority.

CMVs are large DNA viruses of the *Herpesviridae* family; they show strict species specificity. Several animal models of embryonic or neonatal CMV infection of the brain have been reported [4]. Although CMVs of various species exhibit similarities in genome content as well as in cell and tissue tropisms and in pathological consequences, the exploration of congenital CMV infection in animal models has yet proven to be problematic. Indeed, differences in placental layer organization preclude materno-fetal transmission of CMV infection in rodents. Intraperitoneal, transplacental, or intracerebroventricular routes of CMV inoculation have been used to solve this issue, each having its own advantages and limitations. Notwithstanding the inherent variability of CMV infections, different periods of injection, and various developmental

time points, cell types, and possible consequences were studied - hence the difficulties in getting a clear and convergent picture of the pathophysiological mechanisms. Despite those difficulties and discrepancies, recent findings have suggested that inflammatory processes may play an important role in the pathophysiology of brain CMV infection [5]. Notably the existence of brain immune reactions to murine CMV (MCMV) infection has been reported in neonatal mouse models. Such reactions might include the infiltration by mononuclear cells such as T cells and monocytes, and the production of various chemokines and pro-inflammatory cytokines by glial and microglial cells [6]. It has been proposed that the early recruitment of natural killer (NK) cells, of neutrophils and of monocytes initiates clearance of MCMV [7]. It was also recently shown that following *in utero* intraplacental MCMV infection, brain macrophages that had infiltrated the fetal brain showed abnormal activation and were the major infected cells [8]. Whereas murine models of brain CMV infection have brought recent insights into the possible pathogenesis of brain CMV infection, alternative models in other species that would take into account *in utero* events, are needed to confirm and expand those findings, particularly concerning the early developmental stages following CMV infection of the fetal brain. The generation and the study of more complementary animal models of different types, differing in the CMV strains and animal species, in the developmental period of viral inoculation, and in the experimental design, should also better reflect the huge variability in prenatal events, in brain structural and functional anomalies, and in clinical outcome, associated with the corresponding human congenital CMV infections.

In the present study, we have created a novel model of *in utero* rat CMV (RCMV) infection by intracerebroventricular (icv) injections into the rat brain at embryonic day 15 (E15). This model recapitulated several key features of the corresponding human congenital disease as well as of the previously reported murine models. Our findings suggest that the early alteration in the activation state of microglial cells, the infiltration by peripheral leukocytes, and the transcriptional dysregulation of various chemokines, might play an important role in the initial stages following CMV infection of the developing brain *in utero*.

Material and methods

Ethical statement

All animal experimentations were performed in accordance with the French legislation and in compliance with the European Communities Council Directives (2010/63/UE). Research on animals was authorized by the French department of agriculture and the local veterinary authorities (*Comité d'Ethique en Expérimentation Animale* n°14) under licence n°01010.02. All surgical procedures were done under anesthesia and all efforts were made to reduce suffering.

RCMV strain

The rat cytomegalovirus (RCMV) recombinant Maastricht strain (RCMV-Δ145-147-gfp) with a green fluorescent protein (GFP) expression cassette was reported previously (Baca Jones et al. 2009 (Baca Jones, 2009 #14)). Briefly, supernatants of infected rat fibroblasts (RFL-6; ATCC CCL-192) were first spun at 3000 rpm for 20 min to remove cell debris, and then pelleted for 3 h at 14000 rpm (Beckman SW28). The virus pellet was resuspended in Minimal Essential Medium (MEM) culture media. Then, a second centrifugation was performed at 20000 rpm (Beckman SW41) through a sucrose cushion (15% sucrose, 50 mM Tris, 12 mM KCl, 5 mM EDTA) followed by careful resuspension of the virus pellet in VSP buffer (50 mM Tris, 12 mM KCl, 5 mM EDTA). Virus stocks were stored in aliquots at -80^{o} C. Titration of virus stocks was performed by standard plaque assays.

Intracerebroventricular (icv) RCMV infection

Wistar rats (Janvier Labs, France) were raised and mated at the INMED Post Genomic Platform (PPGI) animal facility and kept at room temperature under conditions of optimal health hygiene. *In utero* injections were performed as previously described [9] in embryos from timed pregnant rats (embryonic Day 15, E15) that were anaesthetized with ketamine (100 mg/kg) / xylazine (10 mg/kg). In each embryo, 1 µl of minimal essential medium (MEM) with Fast Green

(2 mg/ml; Sigma) and 5% fetal calf serum, either containing 3.5 10^3 plaque forming unit (pfu) of RCMV, or not (control), was injected icv *via* pulled glass capillaries and a microinjector (PV 820 Pneumatic PicoPump, World Precision Instruments).

Immunohistochemistry experiments

Immunohistochemistry experiments were carried out as described previously [9] on coronal brain slices (50-100 µm, vibratome, Microm; 14 µm, cryostat, Leica) with the appropriate primary (Supplemental Table 1) and secondary (Alexa Fluor_568 or 647-conjugated goat anti-rabbit, anti-mouse, anti-rat, anti-guinea pig IgGs or donkey anti-goat IgGs; Life Technologies) antibodies. Hoescht 33258 (1:2000, Sigma) was used for nuclei staining.

Microscopy and cell counting

Images were acquired by using a Stereo Microscope Olympus SZX16 equipped with digital camera DP73, or a Zeiss Axio Imager Z2 microscope with structured illumination (ApoTome) equipped with Zeiss AxioCam MRm camera and processed using Axiovision software, or with a confocal laser scanning microscope Leica TCS SP2 equipped with a CoolSNAP camera. For cell counting analyses, at least three adjacent brain sections were analyzed throughout the entire z-dimension for each sample. Images were acquired using the 40x oil-immersion objective and cells were counted in each brain with Image J Software [10] at E17 and E20, and with Cell Profiler cell image analysis software (Broad Institute Cambridge, MA, USA) at P1. Activation index of microglia in a given region of interest (ROI) was defined as the ratio between the number of $Iba1^+$ $Ed1^+$ cells and the total number of $Iba1^+$ cells.

Quantitative reverse transcription polymerase chain reaction (qRT-PCR)

Total RNAs were extracted from whole embryonic brains (RCMV-infected and control conditions, respectively) taken at various developmental stages (E16, E17, P1) (n = 8 brains per stage in each condition) using TRIZOL reagent according to manufacturer's instructions (Life

Technology). cDNA was synthesized from 1 μg of total RNA using Quantitect Reverse Transcription Kit and according to manufacturer protocol (Qiagen). RT-PCRs were then carried out using SYBR-Green chemistry (Roche Diagnostics) and Roche amplification technology (Light Cycler 480). PCR primers (S2 Table) were designed for 11 rat genes encoding classical cytokines (Il-6, Il-1β, Il-10), chemokines (Ccl2, Ccl3, Ccl4, Ccl7, Ccl12), chemokine receptors (Ccr2, Ccr5), and growth factor Tnf-α, for two RCMV genes encoding viral chemokines r129 and r131, and for control gene *Rpl19* (ribosomal protein L19) for relative quantification. All primer pairs were optimized to ensure specific amplification of the PCR product and the absence of any primer dimer. Quantitative PCR standard curves were set up for all. Values of fold change represent averages from duplicate measurements for each sample.

Flow cytometry

For dissociation into single cell suspension, entire control or CMV-infected brain tissues obtained from embryos at E17, and from anesthetized P1 pups perfused with 2-3 mL of phosphate-buffered saline (PBS), were mechanically homogenized in ice-cold Hank's buffer. Brain homogenates were centrifuged through a continuous 30% Percoll gradient (7750 g, 40 min.) and the bottom phase containing leukocytes was filtered using cell strainers (70 μm). Cells collected in ice-cold Hank's buffer were centrifuged (600g, 5 min.) and suspended in FACS buffer (D-PBS 0.01 M pH 7.4, EDTA 1 mM, BSA 1%). 1 to 3 $x10^6$ cells were then incubated with Zombie NIR Fixable Viability kit (1:200; Biolegend) for 20 min at room temperature to discriminate between live and dead cells. Fc receptor were blocked using with mouse anti-rat CD32 antibody (FcγII receptor clone D34-485) for 10 min. at 4°C to prevent against nonspecific binding. Cells were then stained with antibodies against combinations of cell surface markers (Supplemental Table 1) in PBS 1% FCS 2 mM EDTA for 45 min. at 4°C, washed twice in FACS buffer, and finally incubated in FACS buffer containg 2% (v/v) PFA. An average of 1.3 $x10^5$ living singlet cells were analyzed per embryo equivalent on a BD LSRFortessa (BD Bioscience) cell cytometer and raw data were analyzed using FACSDiva V8.0 software (BD Biosciences).

Statistics

Data were expressed as mean ± SEM unless otherwise stated. Mann-Whitney test (two-tailed) was used in cell counting analyzes to compare between CMV-infected and control brains, with the appropriate adjustment for multiple comparisons (Bonferroni) whenever appropriate. qRT-PCR and flow cytometry data were also analyzed by Mann-Whitney test, two-tailed, to check for significant differences between RCMV-infected and control brains.

Results

Time course of RCMV infection in the rat fetal brain

The kinetics of infection by GFP-expressing recombinant RCMV within the fetal brain was analyzed after icv injection at E15 by detection of green fluorescent protein (GFP) in the infected cells. GFP detection was indeed more effective in assessing the presence of active RCMV within the cells, than antibodies against viral protein R44 (S1A Fig.). As expected and also recently shown in the case of its murine CMV counterpart [8], RCMV was increasingly detected in the brain after icv injection. At E16 (*i.e.* 24h after icv injection), no GFP was detected (n = 8 embryonic brains) (data not shown). At E17, only a few GFP-positive (GFP^+) cells were seen, mostly in the choroid plexi and in the thalamic and hypothalamic areas (n = 18 embryonic brains) (Fig. 1). At E20, more GFP^+ cells were detected and the infection expanded to other brain areas (olfactory bulbs, lateral ventricles) (n = 46 embryonic brains) (Fig. 1). At P1, there was a dramatic increase in the number of infected cells, and in the frequency at which GFP could be detected in a given brain area; this included the choroid plexi, the ventricular and subventricular zones and notably the thalamic and hypothalamic areas, and the olfactory bulbs (n = 38 brains) (Fig 1). CMV was also consistently detected in the meninges, the cerebellum, the inner ear and the hippocampal area (data not shown). In line with the increasing number of infected cells and with the expansion of CMV infection to more brain areas, GFP and R44 gene expressions also increased from E16 to P1 (S1B Fig.).

Most RCMV-infected cells are of the myeloid or lymphoid lineages

The infected cell types were first characterized by immunohistochemistry experiments at E17 and P1 developmental stages. The majority of infected (GFP^+) cells in the choroid plexi and in the lateral ventricular areas were $Iba1^+$, $CD45^+$ immune cells likely corresponding to microglia/brain macrophages (Fig2A; S2 Fig). Other GFP^+ cell types were occasionally detected (S3 Fig.). This included cells expressing NG2, a marker of pericytes and oligodendrocytes

precursors, and cells expressing S100β, a marker of ependymal cells and of astrocytes. RCMV was also detected in some aquaporin-1 expressing epithelial cells of the choroid plexi. No GFP signal was detected in $NeuN^+$ mature neuronal cells (data not shown). Although $nestin^+$ radial glial progenitor cells did not show GFP expression, infected $Iba1^+$ cells were frequently found in close contact with radial glial cells (S4A Fig.). Interestingly, the structure of the radial glia lying in the immediate vicinity of such periventricular GFP^+, $Iba1^+$ infected cells was altered while it appeared unaltered for radial glia located more distal to the site of infection (S4B Fig.). No broad alteration in the cortical lamination of the dorsal telencephalon was significantly detected at P1 with markers of deep (Foxp2), intermediate (Ctip2) and upper (Cux1) cortical layers, as compared with control (MEM-injected) situation (data not shown). As mentioned above, only a few infected cells were detected at E17, and very rarely in the ventricular zone of the dorsal telencephalon (Fig. 1); as E17 nearly corresponds to the end of the period when radial glia-guided neuronal migration occurs (E12-E18), lamination may only be altered unfrequently and at very localized areas in the present model. Also, such localized anomalies of cortical lamination caused by focal alterations of radial neuronal migration may well have escaped detection.

To characterize further the phenotype of brain immune cells infected with RCMV, flow cytometry analysis was performed at P1 (n = 18 brains) on $CD45^+$ hematopoietic cells. Hematopoietic cells were separated in three populations according to their CD11b and CD45 expression profile to differentiate between brain resident microglial cells from other infiltrating myelo-monocytic and lymphocytic cell populations, as previously reported [11](Fig. 2B). Among these subsets, RCMV infected cells were identified by analyzing the expression of GFP. Of note, the small number of GFP^+ cells at E17 prevented reliable flow cytometry analysis of infected cells at that stage. Amongst the GFP^+, $CD45^+$ cells, 40.7% ± 5.2 were found in fraction I of $CD45^{high}$ CD11b- cells entailing B and T-cells as well as other type of leukocytes. Another 20.9% ± 3.0 of infected leukocytes were $CD45^{high}$, $CD11b^+$ (fraction II) corresponding to myeloid lineage cells (monocytes/macrophages, dendritic cells (DC) and granulocytes). The remaining $CD45^{low/int}$, $CD11b^+$ cells (36.9% ± 4.1) found in fraction III entailed resident microglial cells.

Areas of RCMV infection show an early increase in microglia/brain macrophages activation

Microglial cells/brain macrophages can rapidly shift out of a quiescent state to become activated upon various insults of the central nervous system (CNS), such as infections, stroke, or chemical exposure. In our model, the number of Iba1$^+$ cells and the activation status of those cells, as estimated upon expression of the activation marker Ed1/Cd68 [12] both increased significantly in the RCMV-infected areas of the developing brain at E17 (Fig.3A) and at P1 (Fig.3B), as compared with control brains. Consistently, RCMV infection was accompanied locally by a dramatic change in the morphology of Iba1$^+$ cells, from the ramified phenotype of quiescent cells to the classical amoeboid morphology of activated cells (Fig.3B).

RCMV infection of the developing brain leads to chemokine dysexpression and to an early infiltration by myelomonocytes and by lymphocytes

CMV interferes with the host chemokine/receptor system by dysregulating the expression of cellular chemokines, and by encoding endogenous viral CMV chemokines [13]. Such host and viral chemokines might have promoted infiltration of the brain by monocytes-derived macrophages and by lymphocytes. To determine whether and when the expression of various cytokines and chemokines would be altered upon RCMV infection of the developing brain, qRT-PCR experiments were performed at various developmental stages (S5 Fig.). In addition to the early detection (as from E16) of viral chemokine r129 gene expression, an early, significant and sometimes dramatic increase in the expression of several genes encoding host cytokines (*Il-10*), pro-inflammatory chemokines (*Ccl2*, *Ccl3*, *Ccl4*, *Ccl7*, *Ccl12*) and chemokine receptors (*Ccr2*, *Ccr5*), was detected in the infected brains.

Consistent with this dysregulation of pro-inflammatory chemokines, flow cytometry analysis targeted towards GFP$^+$ infected leukocytes in RCMV-infected brains had already indicated that a subset of those cells had peripheral origin (Fig.2B). To precise the immune phenotype of the cells infiltrating the RCMV-infected brains, mononuclear cells were purified

from whole infected brains at E17 and P1 regardless of their possible infected status and analyzed further by flow cytometry (Fig.4). Hematopoietic cells were separated according to their CD45 and CD11b/c or CD11b expression status. The lineage of the cells found in the different fractions was further precised using additional set of markers. In fraction I, B cells (RT1B$^+$ CD3-), T cells (RT1B- CD3$^+$) and non-B non-T cells (RT1B- CD3-) were resolved. Infiltrating myeloid cells were further separated into dendritic cells (DC, RT1B$^+$ CD11b/c$^+$) and monocytes (CCR2$^+$ CD11b$^+$). Fourty eight hours after RCMV injection, the proportion of B cells and non-B non-T cells as well as monocytes and DCs significantly increased in the infected brains at E17 as compared with control brains (n = nine pools of four embryonic brains each in either condition). As a corollary of such increases in fractions I and II, the relative proportion of the microglia cells (fraction III) significantly decreased. In contrast with the local increase in the activation status of microglia seen at E17 in the infected areas by immunohistochemistry, microglial activation status (fraction IV) remained unchanged in whole E17 brains as identify by the absence of RT1B upregulation [14] (fraction IV). At P1 (Fig.5), the proportion of all three cell populations in fraction I (T, B and non-B non-T cells) increased significantly in RCMV-infected brains. In fraction IIb/c the proportion of DC (RT1B+ CD11b/c+) remained unchanged whereas in fraction II, the proportion of monocyte (CCR2$^+$) was significantly reduced. In addition, the proportion of microglia decreased significantly; however and in contrast with E17, an overall activation of microglia (fraction IV) was significantly observed at P1, likely reflecting the dramatic increase in the number of CMV-infected brain areas (Fig.1) and the increased expression of proinflammatory cytokines (S5 Fig.) seen from E17 to P1.

Discussion

Because of the species-specificity of CMVs, animal models of congenital CMV infection of the developing brain have been designed in order to decipher the underlying pathogenesis. Hence, various antenatal and neonatal rodent models with intracranial, intraperitoneal or intraplacental CMV inoculation have been used, particularly in the mouse. In the present study, we have designed and developed a model of RCMV infection *in utero*, where the virus is being inoculated directly into the cerebral ventricles of the embryos at a specific developmental time-point. Whereas the use of neonatal models of brain CMV infection has brought important insights into the possible pathogenic mechanisms, antenatal models that also take into account *in utero* events are needed. As an example, the period of expansion of RCMV dissemination seen in the rat model reported here between E20 and P1, paralleled the burst of microglial dissemination occurring as from E19-E20 in the normal developing rat brain [15]. Generally, events preceding and surrounding birth might be critical in modulating the consequences of intrauterine insults [16]. Intraventricular mode of administration as used here and elsewhere [17,18]. obviously does not recapitulate the time course of mother-to-fetus and periphery-to-brain transmission of the human pathology. However it is very appropriate for investigating the early events that follow infection of the developing CNS. It also limits the huge variability of other complicated events taking place in the placenta and in peripheral tissue prior to brain infection. Despite its relative simplicity and inherent limitations, our model shared several aspects in common with human congenital CMV infection, including focal infection of the periventricular areas surrounding the lateral and third ventricles. Notably the detection of RCMV in the periventricular zones recalled the periventricular localization of calcifications classically seen in human congenital CMV ventriculoencephalitis. Other convergent localizations with the human disease were the frequent infection of the inner ear, of the olfactory bulbs and of the hippocampal area, as seen in infected fetuses [19,20]. Periventricular areas and olfactory bulbs, but also choroid plexi, are major sites of early infection in neonatal murine models of brain infection by other types of viruses such as

coxsackievirus B3 [21] and lymphocytic choriomeningitis virus [22]. Generally choroid plexi, which represent a key interface between blood and cerebrospinal fluid, may play multiple pathogenic roles, either as entry and dissemination sites of pathogens into the CNS, or as sources of cytokines and chemokines production and of recruitment of immune cells. The role of choroid plexi in the pathogenesis of meningitis caused by coxsackievirus B3 has indeed recently been emphasized [23].

At the cellular level, the frequent and early detection of RCMV in microglial cells and in brain macrophages as shown here, confirmed previous findings indicating that such brain immune cells are infected not only by human CMV in fetuses [20], but also by MCMV in murine models of *in utero* intraplacental infection [8] or of neonatal intracerebral infection [24]. Microglia might well be the primary target of CMV upon brain infection of the developing brain; as a matter of fact, microglia express several different integrins including beta-1 integrin [25], and it was recently shown that beta-1 integrin expressing cells were the primary infected cells in a mouse model of neonatal infection [18]. In contrast with murine models, neural progenitor cells (NPCs) were not targeted here, at least from two to seven days after RCMV inoculation. This might reflect peculiar attenuated neural tropism of the RCMV strain used here. Alternatively, NPCs from various species or even from various strains of rat might show strikingly different susceptibility to CMV entry or replication. As mentioned above, the frequent, immediate nearness of nestin NPCs with infected GFP microglial cells could sometimes even have been mistaken as an actual colocalization of the two molecules, which could be excluded only with closer and 3D systematic examinations. Indeed, microglial cells closely adjacent to nestin cells have also been detected in murine neonatal pups [26]. Nevertheless the corresponding local alterations of the radial glia structure found in our model indicated that NPCs were indirectly altered by the presence of infected cells in their immediate neighborhood.

CMV infection was associated with an early activation of microglia at the site of active CMV infection, with an infiltration by peripheral immune cells, and with an early increase in chemokine gene expression. There has indeed been increasing and convergent evidence in various

murine models for the important role of inflammation associated with innate and adaptive immune responses in the pathophysiology of congenital CMV infection of the brain [27] [5,8,28,29],[7]. Also, histopathological studies on human brains from autopsied fetuses detected frequent microglial nodules [20]. Here, infiltrating myelomonocytes and lymphocytes were detected at E17, whereas at P1, lymphocytes were detected as the main infitrating population. Induction by human CMV of monocyte migration and differentiation into macrophages has already been demonstrated [30,31]. Also, it was shown that following intraperitoneal injection of CMV in newborn mice, monocytes/macrophages were amongst the most abundant early infitrating cells, whereas lymphocytes represented the majority of cells thereafter [7]. In our model, several genes encoding monocytes and lymphocytes chemoattractants were upregulated early upon CMV inoculation. This included viral protein r129, which was recently shown to attract lymphocytes and macrophages [13], and cellular chemokines CCL2 and CCL12. Chemoattractant protein CCL2 expression by microglial cells promotes the infiltration of monocytes into the brain [32], whereas CCL12 expression in the choroid plexus was shown to play a crucial attracting role on peripheral cells of the myeloid lineage following coxsackievirus infection of the neonatal brain [33].

The early recruitment of peripheral immune cells, especially monocytes and DCs, and the increased activation of microglial cells are likely to play important roles in the pathogenesis of congenital CMV infections of the brain. Also, the role of NK cells and of T cells in controlling CMV infection has already been suggested [34]. In particular, there is evidence to suggest that infiltrating monocytes have the capacity to give rise to microglial cells in some models of CNS infection [35]. In our model, the infiltration by monocytes and DC occurred in E17-infected brains but was less prevalent in P1 infected brains as compared to control brains. As the reduction of the monocyte pool was concomitant with an increase of fraction IV cells at P1 stage, it could be inferred that infiltrating monocytes differentiated into activated microglia in the course of congenital CMV infection. Whereas early microglial activation within the sites of productive infection is likely to regulate CMV infection, it might also have detrimental effects. Notably the

role of microglia in shaping the brain during development, including synaptogenesis, synaptic pruning, or neocortical interneuron positioning, and in modulating synaptic plasticity and neuronal networks, is increasingly recognized [36]. The direct targeting of microglial cells by CMV and the modification in the activated state of microglia *in utero* might well have postnatal impact on brain functioning and pathology [37], strongly influencing, or at least interfering with, the outcome of congenital CMV infection and the severity of the related neurological manifestations. As an example, long-lasting effects of transient activation of microglia on adult neurogenesis in the olfactory bulb have been reported [38]. Generally disturbance in microglia functioning likely participates in various disorders of the CNS [39]. In the present rat model, CMV prominently targeted microglial cells and macrophages. This model thus represents a very useful and quite unique tool to decipher the specific pathogenic involvement of those cells, which are likely to contribute the corresponding human congenital disease. Ongoing and future studies will help in determining which important role those immune responses actually play, whether they are favorable or detrimental to CMV dissemination within the developing brain, and how they would cause or influence the possible postnatal emergence of various cerebral disorders.

Acknowledgments

We thank F. Michel at inMAGIC (INMED Imaging Centre), F. Bader and S. Corby (INMED animal core facilities), L Castelein for technical support, H Child (Oxford University, UK) for his help as a trainee *via* the BIOTRAIL international student exchange program, and all the administrative staff at INMED. We also thank R. Charrel (EPV UMR_D190, Aix-Marseille University, France) for his advices at the onset of the project, G. Grauls (Department of Medical Microbiology, Maastricht University, The Netherlands) for the gift of anti-R44 producing hybridoma, A. Fontbonne (UMR 7260, Aix-Marseille University, France) for his help in inner ear analysis, and C. Sapet and O. Zelphati at OZ Biosciences (Marseille, France) for their kind help and support.

References

1. Manicklal S, Emery VC, Lazzarotto T, Boppana SB, Gupta RK (2013) The "silent" global burden of congenital cytomegalovirus. Clinical microbiology reviews 26: 86-102.
2. Wang D, Fu TM (2014) Progress on human cytomegalovirus vaccines for prevention of congenital infection and disease. Current opinion in virology 6: 13-23.
3. Cheeran MC, Lokensgard JR, Schleiss MR (2009) Neuropathogenesis of congenital cytomegalovirus infection: disease mechanisms and prospects for intervention. Clinical microbiology reviews 22: 99-126, Table of Contents.
4. Cekinovic D, Lisnic VJ, Jonjic S (2014) Rodent models of congenital cytomegalovirus infection. Methods in molecular biology 1119: 289-310.
5. Kosmac K, Bantug GR, Pugel EP, Cekinovic D, Jonjic S, et al. (2013) Glucocorticoid treatment of MCMV infected newborn mice attenuates CNS inflammation and limits deficits in cerebellar development. PLoS pathogens 9: e1003200.
6. Cheeran MC, Hu S, Yager SL, Gekker G, Peterson PK, et al. (2001) Cytomegalovirus induces cytokine and chemokine production differentially in microglia and astrocytes: antiviral implications. Journal of neurovirology 7: 135-147.
7. Slavuljica I, Kvestak D, Huszthy PC, Kosmac K, Britt WJ, et al. (2015) Immunobiology of congenital cytomegalovirus infection of the central nervous system-the murine cytomegalovirus model. Cellular & molecular immunology 12: 180-191.
8. Sakao-Suzuki M, Kawasaki H, Akamatsu T, Meguro S, Miyajima H, et al. (2014) Aberrant fetal macrophage/microglial reactions to cytomegalovirus infection. Annals of clinical and translational neurology 1: 570-588.
9. Salmi M, Bruneau N, Cillario J, Lozovaya N, Massacrier A, et al. (2013) Tubacin prevents neuronal migration defects and epileptic activity caused by rat Srpx2 silencing in utero. Brain : a journal of neurology 136: 2457-2473.
10. Schneider CA, Rasband WS, Eliceiri KW (2012) NIH Image to ImageJ: 25 years of image analysis. Nature methods 9: 671-675.
11. Campanella M, Sciorati C, Tarozzo G, Beltramo M (2002) Flow cytometric analysis of inflammatory cells in ischemic rat brain. Stroke; a journal of cerebral circulation 33: 586-592.
12. Colton CA (2009) Heterogeneity of microglial activation in the innate immune response in the brain. Journal of neuroimmune pharmacology : the official journal of the Society on NeuroImmune Pharmacology 4: 399-418.
13. Vomaske J, Denton M, Kreklywich C, Andoh T, Osborn JM, et al. (2012) Cytomegalovirus CC chemokine promotes immune cell migration. Journal of virology 86: 11833-11844.
14. Ponomarev ED, Veremeyko T, Barteneva N, Krichevsky AM, Weiner HL (2011) MicroRNA-124 promotes microglia quiescence and suppresses EAE by deactivating macrophages via the C/EBP-alpha-PU.1 pathway. Nature medicine 17: 64-70.
15. Cunningham RL, Lumia AR, McGinnis MY (2013) Androgenic anabolic steroid exposure during adolescence: ramifications for brain development and behavior. Hormones and behavior 64: 350-356.
16. Ben-Ari Y (2015) Is birth a critical period in the pathogenesis of autism spectrum disorders? Nature reviews Neuroscience 16: 498-505.
17. Shinmura Y, Kosugi I, Aiba-Masago S, Baba S, Yong LR, et al. (1997) Disordered migration and loss of virus-infected neuronal cells in developing mouse brains infected with murine cytomegalovirus. Acta neuropathologica 93: 551-557.
18. Kawasaki H, Kosugi I, Sakao-Suzuki M, Meguro S, Arai Y, et al. (2015) Cytomegalovirus initiates infection selectively from high-level beta1 integrin-expressing cells in the brain. The American journal of pathology 185: 1304-1323.

19. Teissier N, Delezoide AL, Mas AE, Khung-Savatovsky S, Bessieres B, et al. (2011) Inner ear lesions in congenital cytomegalovirus infection of human fetuses. Acta neuropathologica 122: 763-774.
20. Teissier N, Fallet-Bianco C, Delezoide AL, Laquerriere A, Marcorelles P, et al. (2014) Cytomegalovirus-induced brain malformations in fetuses. Journal of neuropathology and experimental neurology 73: 143-158.
21. Feuer R, Mena I, Pagarigan RR, Harkins S, Hassett DE, et al. (2003) Coxsackievirus B3 and the neonatal CNS: the roles of stem cells, developing neurons, and apoptosis in infection, viral dissemination, and disease. The American journal of pathology 163: 1379-1393.
22. Bonthius DJ (2012) Lymphocytic choriomeningitis virus: an underrecognized cause of neurologic disease in the fetus, child, and adult. Seminars in pediatric neurology 19: 89-95.
23. Schwerk C, Tenenbaum T, Kim KS, Schroten H (2015) The choroid plexus-a multi-role player during infectious diseases of the CNS. Frontiers in cellular neuroscience 9: 80.
24. Kosugi I, Kawasaki H, Arai Y, Tsutsui Y (2002) Innate immune responses to cytomegalovirus infection in the developing mouse brain and their evasion by virus-infected neurons. The American journal of pathology 161: 919-928.
25. Nutile-McMenemy N, Elfenbein A, Deleo JA (2007) Minocycline decreases in vitro microglial motility, beta1-integrin, and Kv1.3 channel expression. Journal of neurochemistry 103: 2035-2046.
26. Zusso M, Methot L, Lo R, Greenhalgh AD, David S, et al. (2012) Regulation of postnatal forebrain amoeboid microglial cell proliferation and development by the transcription factor Runx1. The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience 32: 11285-11298.
27. Cheeran MC, Gekker G, Hu S, Min X, Cox D, et al. (2004) Intracerebral infection with murine cytomegalovirus induces CXCL10 and is restricted by adoptive transfer of splenocytes. Journal of neurovirology 10: 152-162.
28. van den Pol AN, Robek MD, Ghosh PK, Ozduman K, Bandi P, et al. (2007) Cytomegalovirus induces interferon-stimulated gene expression and is attenuated by interferon in the developing brain. Journal of virology 81: 332-348.
29. Koontz T, Bralic M, Tomac J, Pernjak-Pugel E, Bantug G, et al. (2008) Altered development of the brain after focal herpesvirus infection of the central nervous system. The Journal of experimental medicine 205: 423-435.
30. Smith MS, Bentz GL, Alexander JS, Yurochko AD (2004) Human cytomegalovirus induces monocyte differentiation and migration as a strategy for dissemination and persistence. Journal of virology 78: 4444-4453.
31. Chan G, Nogalski MT, Stevenson EV, Yurochko AD (2012) Human cytomegalovirus induction of a unique signalsome during viral entry into monocytes mediates distinct functional changes: a strategy for viral dissemination. Journal of leukocyte biology 92: 743-752.
32. D'Mello C, Le T, Swain MG (2009) Cerebral microglia recruit monocytes into the brain in response to tumor necrosis factoralpha signaling during peripheral organ inflammation. The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience 29: 2089-2102.
33. Tabor-Godwin JM, Ruller CM, Bagalso N, An N, Pagarigan RR, et al. (2010) A novel population of myeloid cells responding to coxsackievirus infection assists in the dissemination of virus within the neonatal CNS. The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience 30: 8676-8691.
34. Bantug GR, Cekinovic D, Bradford R, Koontz T, Jonjic S, et al. (2008) CD8+ T lymphocytes control murine cytomegalovirus replication in the central nervous system of newborn animals. Journal of immunology 181: 2111-2123.
35. Getts DR, Terry RL, Getts MT, Muller M, Rana S, et al. (2008) Ly6c+ "inflammatory monocytes" are microglial precursors recruited in a pathogenic manner in West Nile virus encephalitis. The Journal of experimental medicine 205: 2319-2337.

36. Kettenmann H, Kirchhoff F, Verkhratsky A (2013) Microglia: new roles for the synaptic stripper. Neuron 77: 10-18.
37. Harry GJ, Kraft AD (2012) Microglia in the developing brain: a potential target with lifetime effects. Neurotoxicology 33: 191-206.
38. Lazarini F, Gabellec MM, Torquet N, Lledo PM (2012) Early activation of microglia triggers long-lasting impairment of adult neurogenesis in the olfactory bulb. The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience 32: 3652-3664.
39. Prinz M, Priller J (2014) Microglia and brain macrophages in the molecular age: from origin to neuropsychiatric disease. Nature reviews Neuroscience 15: 300-312.

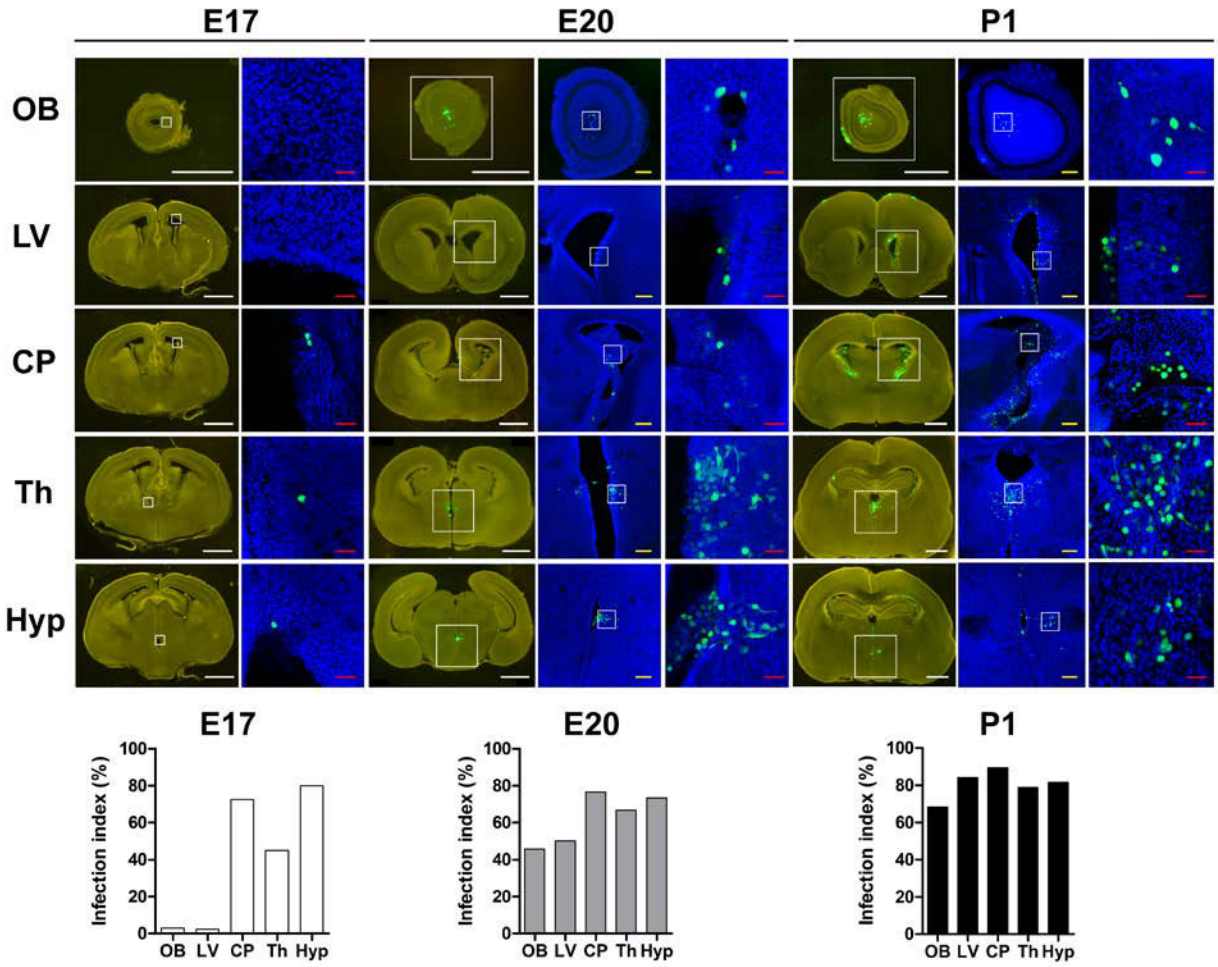


Fig. 1: Time course of rat CMV (RCMV) dissemination in the developing brain.

Recombinant RCMV allowing expression of GFP [26] in the infected cells, was injected intraventricularly at E15. Brains were analyzed at various developmental time points using fluorescent binocular microscopy (left panel of each corresponding stage) and confocal microscopy (right panels of each corresponding stage; blue: Hoechst nucleic acid staining). The number of GFP^+, infected cells, the number of infected areas, and the frequency at which a given area displayed GFP signal (infection index), all increased from E17 (n=18 embryonic brains from two pregnant rats) to E20 (n=46 embryonic brains from five pregnant rats) and P1 (n=38 neonatal brains from four pregnant rats). OB: olfactory bulb. LV: lateral ventricle. CP: choroid plexi. Th: thalamic area of the third ventricle. Hyp: hypothalamic area of the third ventricle. Areas are shown upon a rostrocaudal axis, from top to bottom. White bars: 1 mm; yellow bar: 200 µm; red bar: 40 µm.

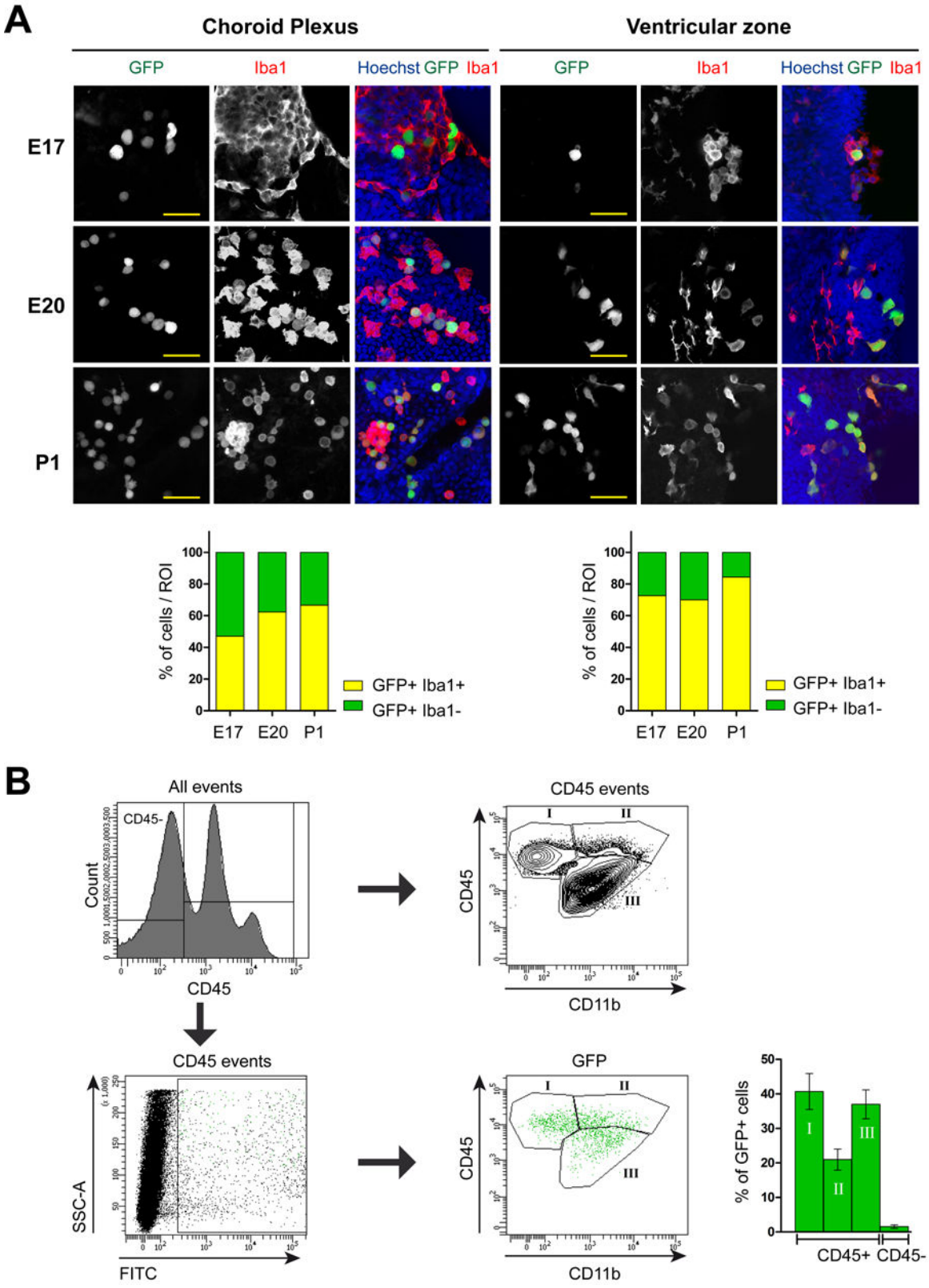


Fig. 2: Early prominent infection of microglial cells and brain macrophages following rat CMV (RCMV) administration *in utero*.

(A) Immunocytochemistry experiments (Top) The choroid plexus and the ventricular area of the infected brains were analyzed using confocal microscopy at various developmental time points (E17, E20, P1) after RCMV (GFP, green) infection at E15.

Coronal slices were stained with antibodies against microglia/macrophages marker Iba1 (red). Nuclei were stained with Hoechst dye (blue). Infected cells expressing GFP [26] frequently showed expression of Iba1 (red) (Bottom) Cell counting demonstrating that a large proportion of infected (GFP^+) cells in the choroid plexus (left) (n = 102 cells at E17; 169 cells at E20; 741 cells at P1) and in the ventricular zone (right) (n = 31 cells at E17; 100 cells at E20; 563 cells at P1) are microglia/macrophages (GFP^+ $Iba1^+$, yellow). ROI (387x387 μm^2): region of interest. Yellow bar: 40 µm.

(B) Characterization of RCMV-infected leukocytes by flow cytometry. Leukocytes were isolated from the infected brains at P1 and then gated for CD45 and GFP expressions. GFP^+ $CD45^+$ cells (top) were further characterized for CD11b (bottom, left) marker. Histograms (bottom, right) show the relative distribution of $CD45^+$ CD11b- cells (fraction I: B cells, T cells and non-B non-T cells), of $CD45^{high}$ $CD11b^+$ cells (fraction II: infiltrating myeloid cells), and of $CD45^{low/int}$ $CD11b^+$ cells (fraction III: microglia), amongst all infected leukocytes. Values are reported as mean ± SEM of 18 RCMV infected brains.

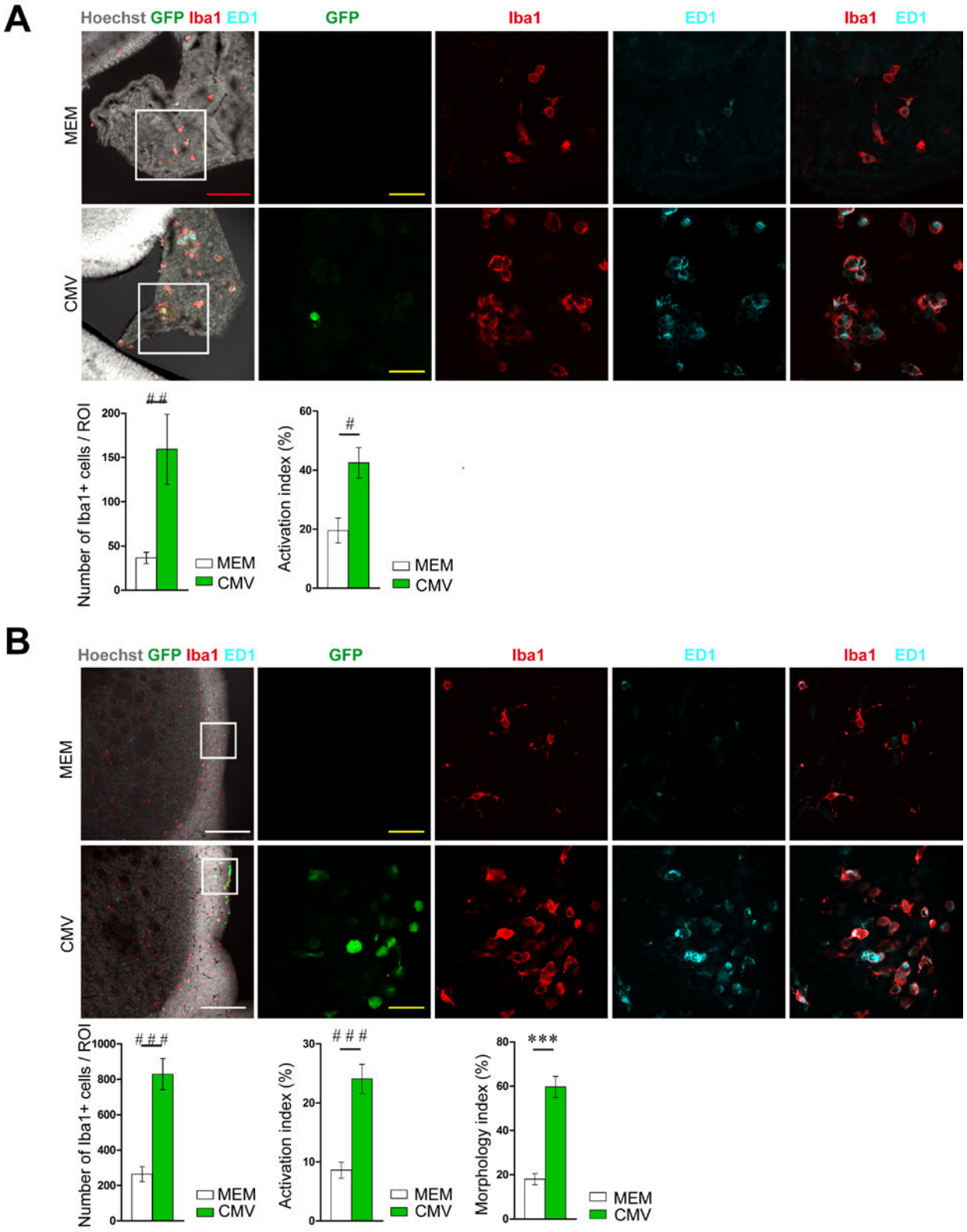

A
Hoechst GFP Iba1 ED1
GFP
Iba1
ED1
Iba1 ED1
MEM
CMV
Number of Iba1+ cells / ROI
##
MEM
CMV
Activation index (%)
#
MEM
CMV
B
Hoechst GFP Iba1 ED1
GFP
Iba1
ED1
Iba1 ED1
MEM
CMV
Number of Iba1+ cells / ROI
###
MEM
CMV
Activation index (%)
###
MEM
CMV
Morphology index (%)
***
MEM
CMV

Fig. 3: Early activation of microglia/brain macrophages in rat CMV-infected areas of the developing brain.

The activation status of macrophages of the choroid plexus (A) and of microglia/macrophages of lateral ventricles (B) were assessed by immunohistological experiments on coronal sections observed by confocal microscopy at E17 (n = 7 brains) and at P1 (n = 8 brains), respectively. Increased number of $Iba1^+$ cells (red) and of their activation status ($Cd68/Ed1^+$, cyan) was demonstrated in CMV-infected areas. Activation index was calculated as the ratio of the number of $Iba1^+$, $Ed1^+$ activated cells versus total number of $Iba1^+$ cells. Morphology index was calculated as the ratio of the number of amoeboid activated, $Iba1^+$ cells versus total number of $Iba1^+$ cells. MEM: minimum essential medium (control condition). CMV: cytomegalovirus. ROI: region of interest (387x387 μm^2). Green fluorescent protein (GFP, green) expression indicates the CMV-infected cells. White bar: 200 μm; red bar: 100 μm, yellow bar: 30 μm. Mann Whitney test, two tailed, with Bonferroni correction wherever appropriate; ***: $p < 0.001$; #: $p < 0.025$; ##: $p < 0.005$; ###: $p < 0.0005$.

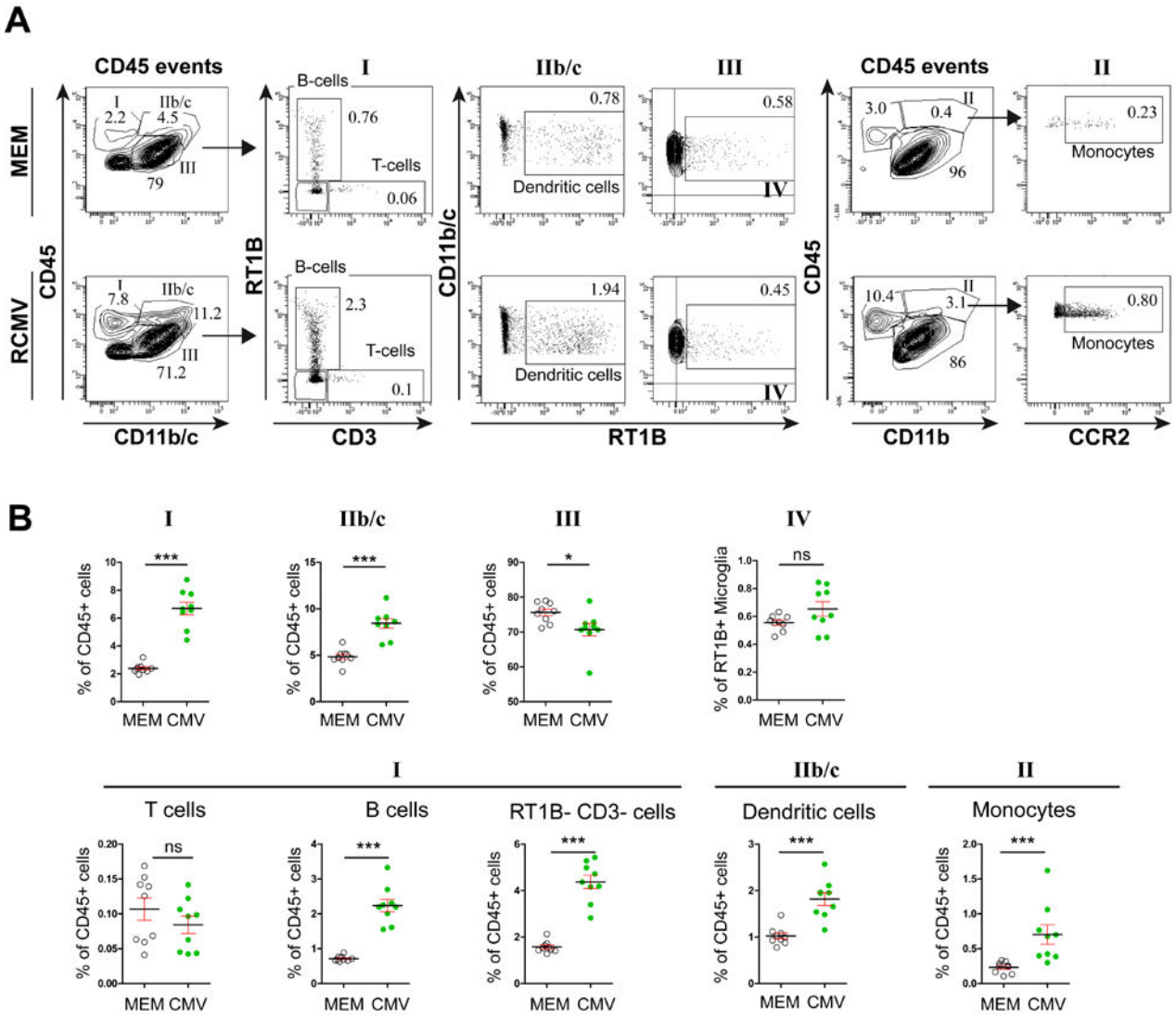


Fig. 4: Flow cytometry analysis of leukocytes collected at E17 from RCMV-infected brains. Total leukocytes (CD45 events) were gated for CD45 and either Cd11b/c or CD11b expressions and further characterized for CD3 and RT1B or for CCR2 expressions, respectively (A) Representative flow cytometry plots in control (MEM-injected) brains and (RCMV) brains. (B) (top) The distribution of fractions I, IIb/c and III as defined according to CD45/CD11b/c expression status, was significantly different in CMV-infected brains as compared with control (MEM) brains at E17. Cells from fraction III (microglia) were further characterized in either conditions according to RT1B expression status, allowing to determine the proportion of activated microglia (fraction IV). No difference in the proportion of activated microglia was observed in the infected brains at E17 (bottom) Cells from fraction I were further characterized in either conditions according to CD3 and RT1B expression status, allowing to distinguish between, T cells, B cells and non-B non-Tcells. The proportions of B cells and of non-B non-T cells increased

significantly in CMV-infected brains at E17. Dendritic cells from fraction IIb/c were characterized in either conditions according to RT1B expression status whereas monocytes were characterized in either conditions according to CD45/CD11b (corresponding to fraction II) and CCR2 expression status. The proportions of dendritic cells and of monocytes increased significantly in CMV-infected brains at E17. All analyzes were performed in either of control (MEM) or infected (RCMV) conditions using nine pools of four embryonic brains each. Values are means ± SEM. The statistical significance of the observed variation in frequency in each cell population is indicated. Mann Whitney test, two tailed; ns: non significant; * : $p < 0.05$; *** : $p < 0.001$.

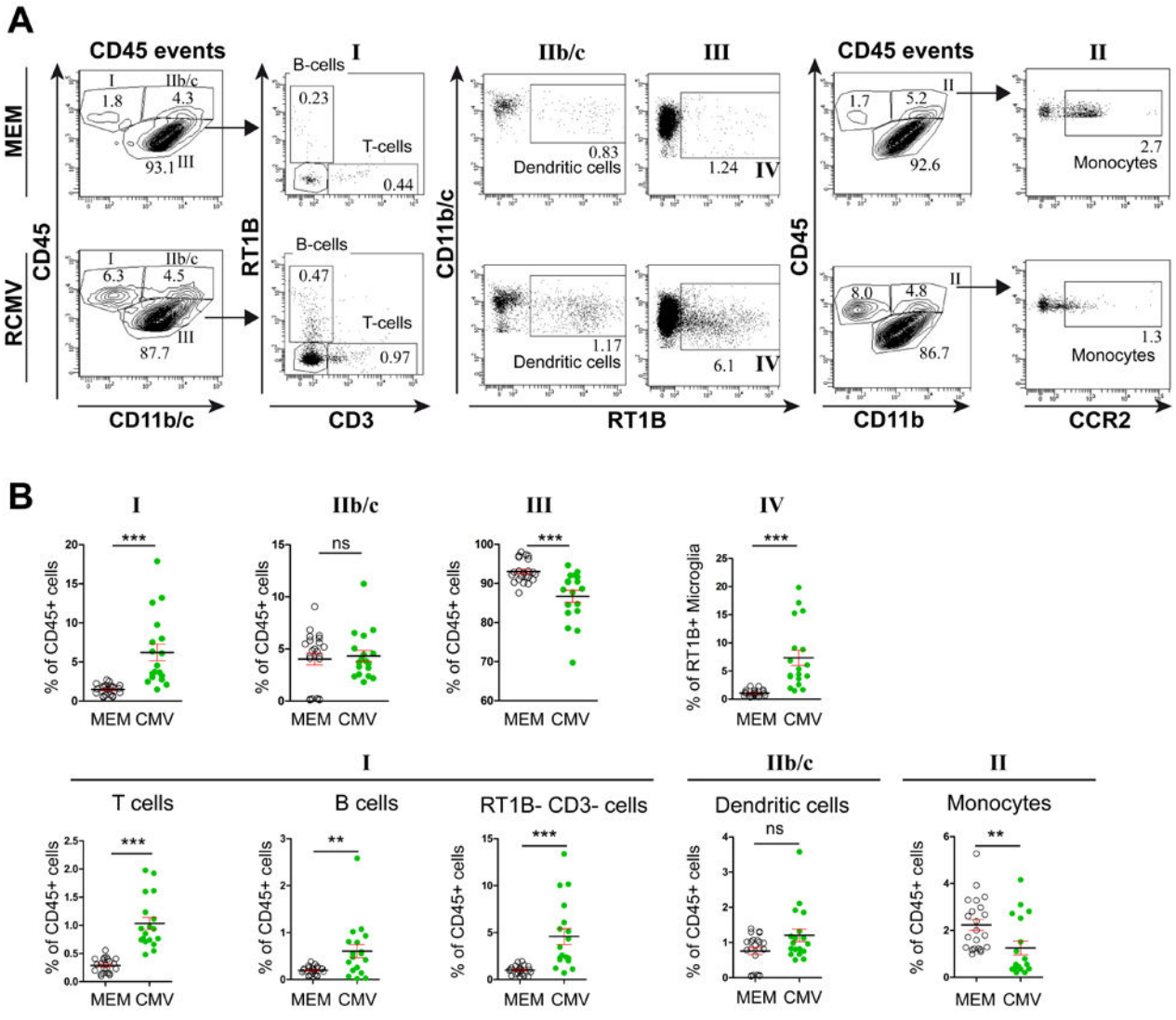


Fig. 5 : Flow cytometry analysis of leukocytes collected at P1 from RCMV-infected brains. Total leukocytes (CD45 events) were gated for CD45 and either Cd11b/c or CD11b expressions and further characterized for CD3 and RT1B or for CCR2 expressions, respectively (A) Representative flow cytometry plots in control (MEM-injected) brains and (RCMV) brains. (B) (top) The distribution of fractions I and III, but not IIb/c, as defined according to CD45/CD11b/c expression status, was significantly different in CMV-infected brains as compared with control (MEM) brains at P1.. Cells from fraction III (microglia) were further characterized in either conditions according to RT1B expression status, allowing to determine the proportion of activated microglia (fraction IV). The proportion of activated microglia increased significantly in the infected brains at P1 (bottom) Cells from fraction I were further characterized in either conditions according to CD3 and RT1B expression status, allowing to distinguish between B cells, T cells and non-B non-T cells. The proportions of T cells, B cells and non-B non-T cells increased significantly in CMV-infected brains at P1. Dendritic cells from fraction IIb/c were characterized in either conditions according to RT1B expression status whereas monocytes were characterized in either conditions according to CD45/CD11b (corresponding to fraction II) and CCR2 expression status.. The proportions of monocytes increased significantly in CMV-infected brains at P1. No difference in the proportion of dendritic cells was observed in the infected brains at P1. All analyzes were performed using 18 (RCMV) and 22 (control condition) brains, respectively. Values are means ± SEM. The statistical significance of the observed variation in frequency in each cell population is indicated. Mann Whitney test, two tailed; ns: non significant; **: $p < 0.01$; *** : $p < 0.001$.

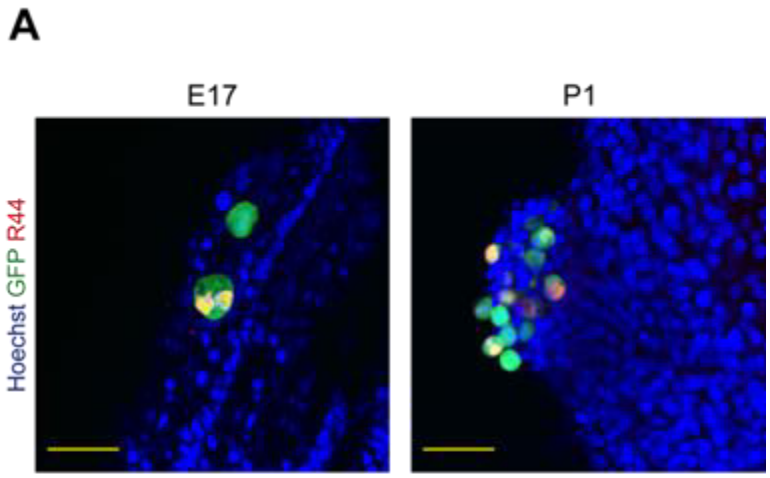
Supporting information online.

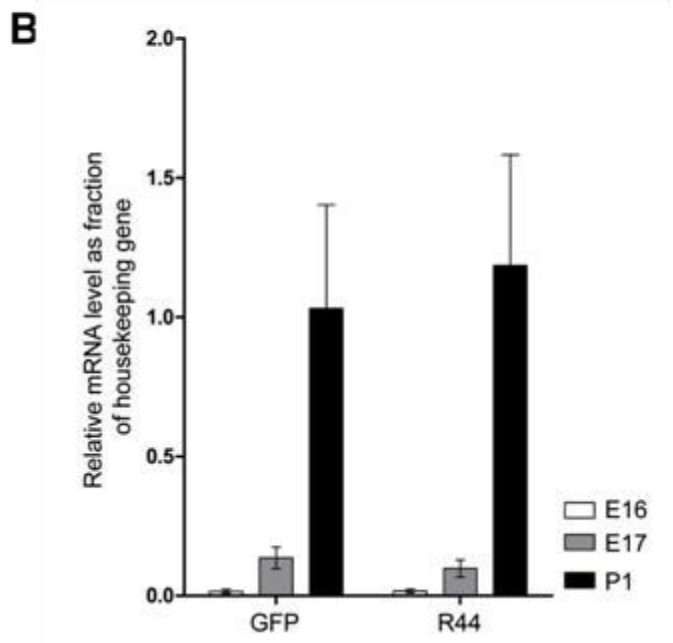
Supporting information online.

S1 Fig. Detection of RCMV-infected cells with GFP and with R44 antibodies, and of *GFP* and *R44* gene expressions.

(A) RCMV-infected cells were detected at E17 (choroid plexi) and at P1 (lateral ventricles). Cells were also detected with antibodies against R44 early/late viral protein (red). Note that GFP was more effective in detecting RCMV-infected cells. Nuclei staining: Hoechst (blue). Scale bar: 30µm

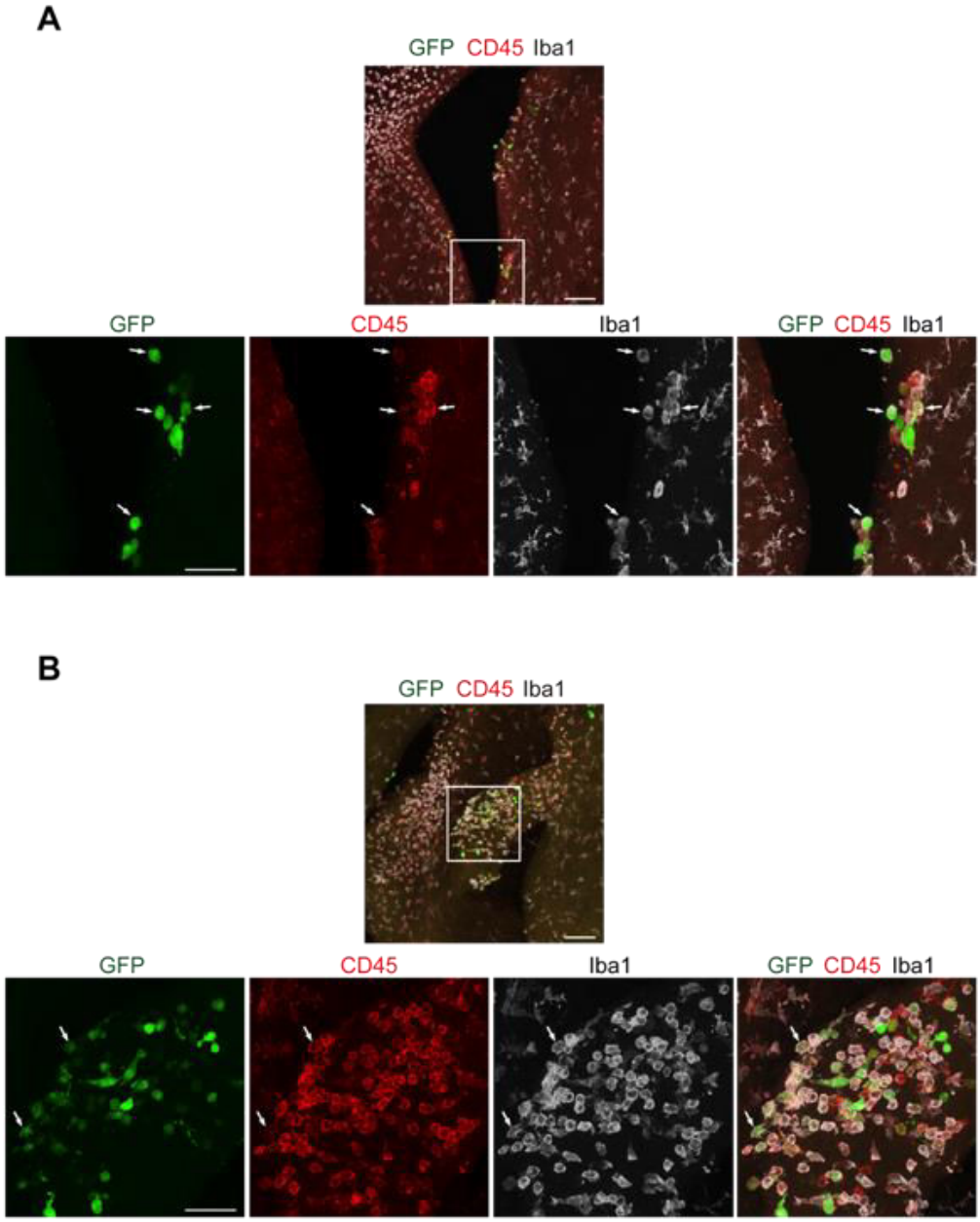
(B) qRT-PCR experiments demonstrated dramatic increase in the relative mRNA expressions of *GFP* and *R44* genes in the RCMV-infected brains, from E16 / E17 to P1.





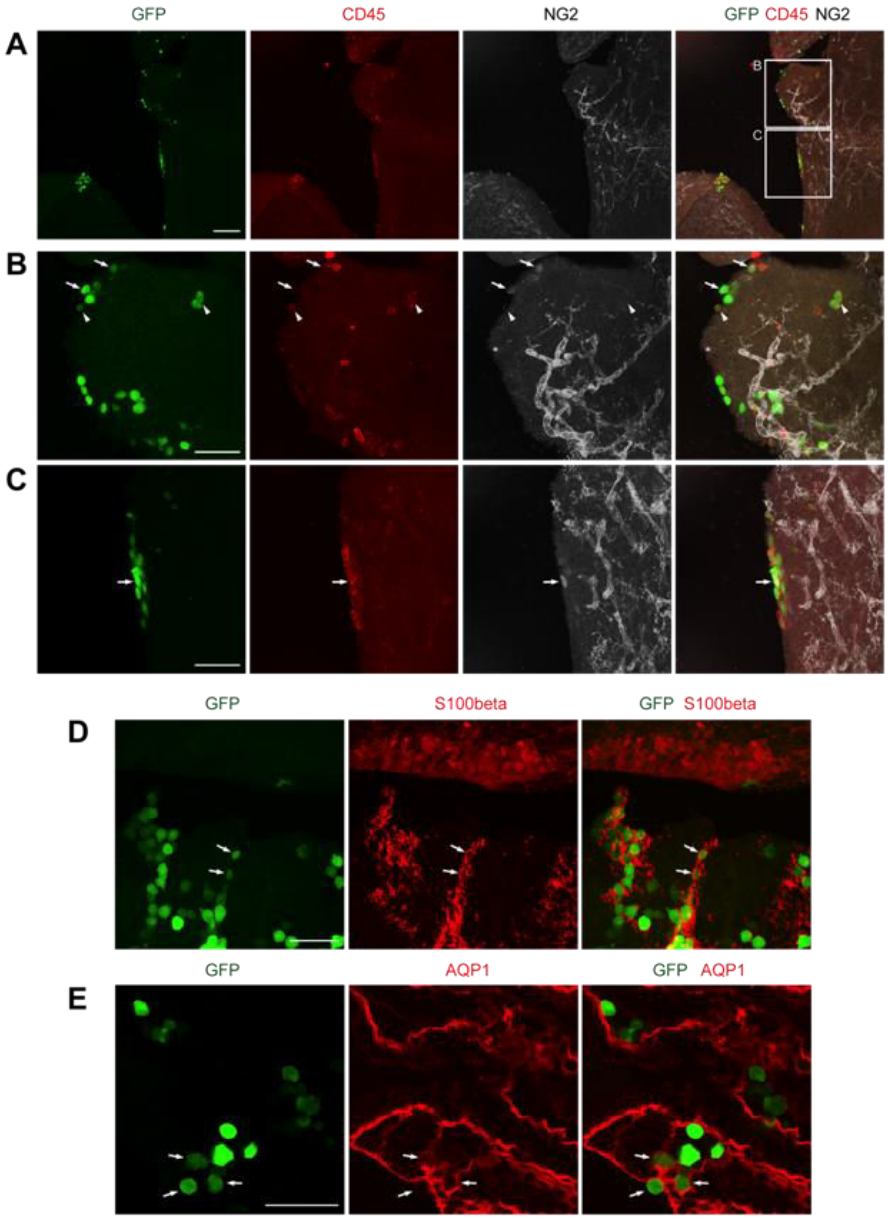
S2 Fig. Colocalization of RCMV-infected brain cells with CD45 and Iba1 markers at P1.

The subventricular zone of the lateral ventricles (A) and the choroid plexi (B) of the RCMV-infected brains were analyzed at P1 after immunohistochemistry on coronal slices, using confocal microscopy after GFP-expressing RCMV infection at E15. Most GFP+ (infected) cells (green) showed expression of CD45 (red) and Iba1 (white). For each brain area, the bottom pictures represent high magnifications (scale bar: 50 µm) of the corresponding boxed area taken from the corresponding top picture (scale bar: 100 µm). Arrows indicate typical examples of colocalizations of GFP, CD45, and Iba1 signals.



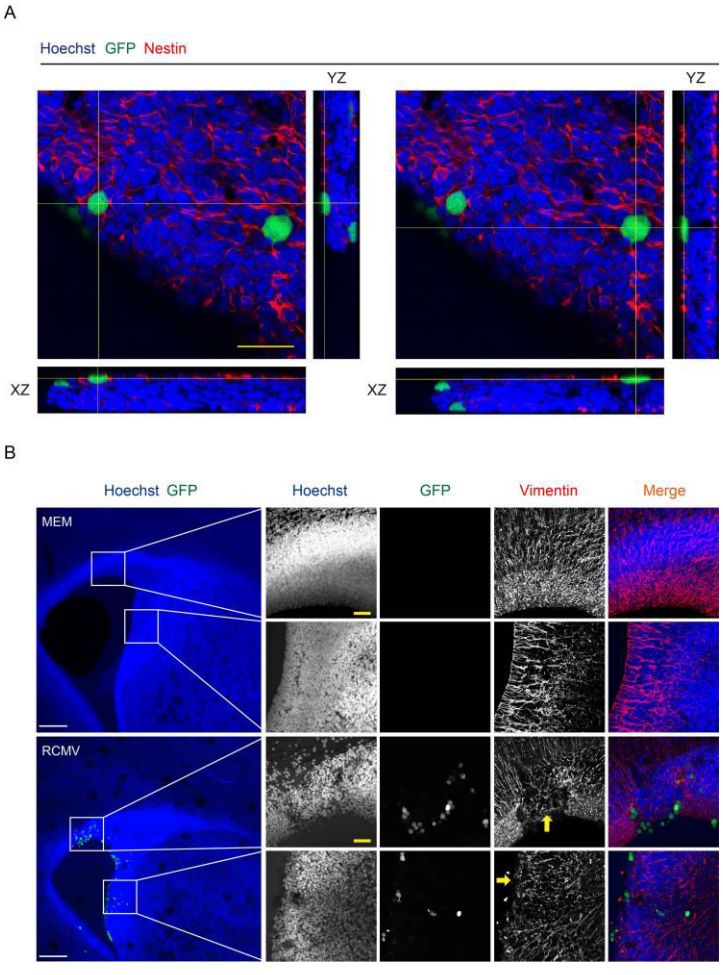
S3 Fig. Colocalizations of RCMV-infected brain cells with NG2, S100beta and AQP1 markers at P1.

RCMV-infected brains were analyzed at P1 after immunohistochemistry on coronal slices, using confocal microscopy after GFP-expressing RCMV infection at E15. Some RCMV-infected cells (GFP, green) showed (A-C) coexpression of CD45 (red) and NG2 (white) in the subventricular zone of the lateral ventricles, or (D) of S100-beta (red) or (E) of AQP1 (red) in the choroid plexus. (B) and (C) represent high-magnification pictures of the corresponding boxed areas shown in (A). Arrows represent typical colocalizations. Arrowheads (B) point to GFP+ cells that colocalize with CD45 but not with NG2. Scale bars (A): 100 µm ; (B-E): 50 µm.



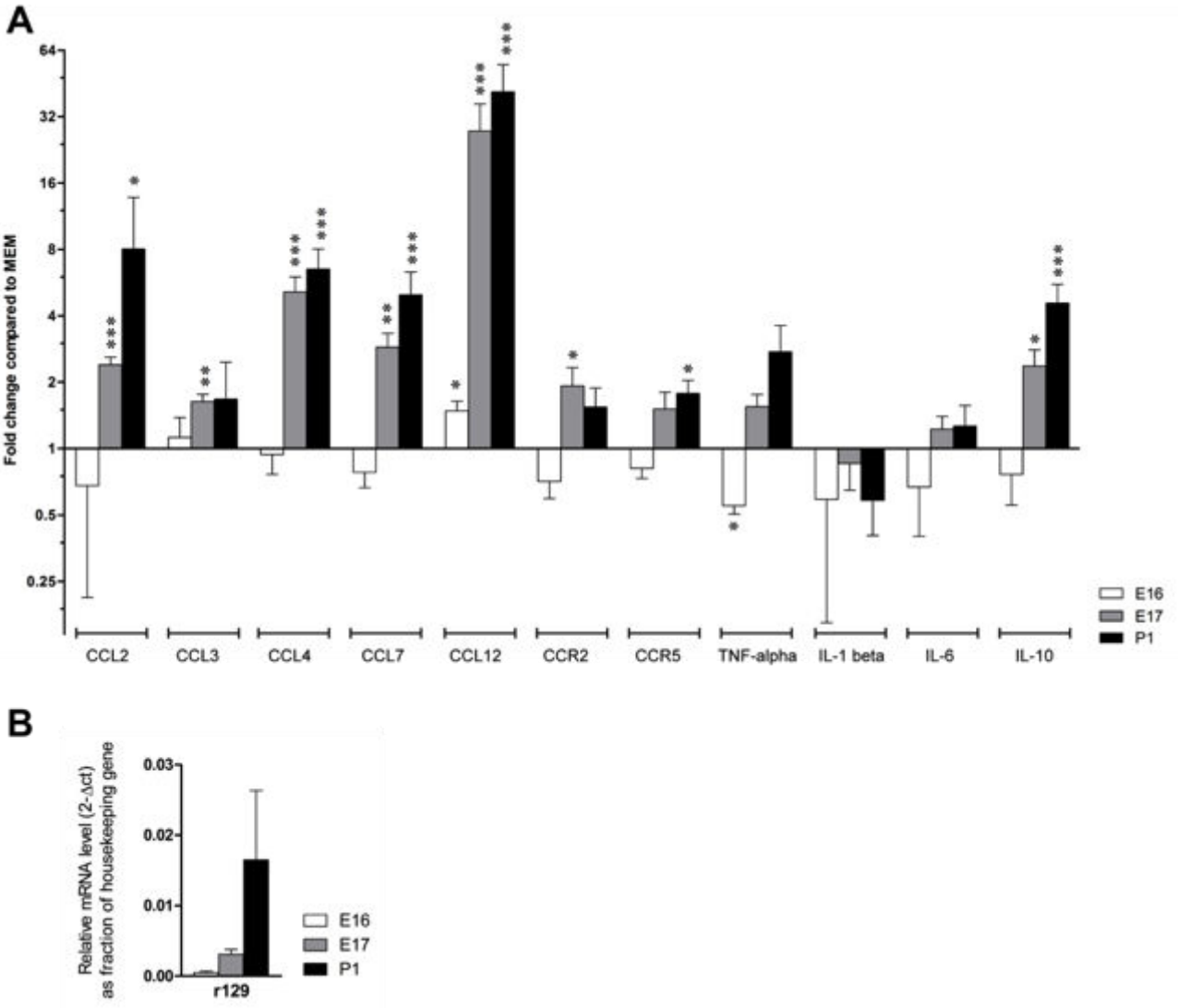
S4 Fig. Lack of infection and altered morphology of radial glial cells in RCMV-infected brains.

RCMV-infected brains were analyzed at P1 after immunohistochemistry on coronal slices, using confocal microscopy after GFP-expressing RCMV infection at E15. (A) Orthogonal view of RCMV-infected cells that were detected closely adjacent to radial glial cells (nestin+; red) in the ventricular zone of lateral ventricles. No colocalization of GFP and nestin was observed (B) The morphology of the radial glia was analyzed at P1 in mock (MEM, top) and RCMV-infected (bottom) brains. Note that the altered structure of radial glia (Vimentin, red) was observed (arrows) only in the presence of closely adjacent RCMV-infected cells (GFP, green) whereas the remaining ventricular walls remain unaltered. For each condition small pictures on the right represent magnifications of the corresponding boxes (dorsal telencephalon and ventral telecenphalon, respectively) taken from the left pictures of the lateral ventricles. Hoechst (blue): nuclear staining. White scale bar: 200µm; yellow scale bar: 30 µm.



S5 Fig. Dysexpression of various cytokines and chemokines genes upon RCMV infection of the developing brain.

A) Bar graphs represent log2-fold changes values in RCMV-infected brains (n=8 for each stage: E16, E17 and P1) *vs* control (MEM) brains (n=8 for each stage), and correspond to averages ± SEM of duplicate measurements. Relative quantification was performed using *RPL-19* as reference gene. Data were analyzed with Mann-Withney test to check for statistically significant differences between RCMV and control conditions (* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$) (B) Relative mRNA levels of viral r129 chemokine gene expression in RCMV-infected brains at E16, E17 and P1.



S1 Table

Supplementary table 1. List of antibodies used in immunohistochemistry and Flow cytometry		
Antibody	Dilution	Supplier
Mouse monoclonal anti-RCMV Rmab-8	1:250	G. Grauls (Department of Medical Microbiology, Maastricht University, The Netherlands)
Rabbit polyclonal anti Iba-1	1:500	Wako chemicals USA
Mouse monoclonal anti rat CD68 clone ED1	1:200	Merck Millipore
Mouse monoclonal anti-Vimentin	1:300	Merck Millipore
Mouse monoclonal anti-NeuN	1:500	Merck Millipore
Rabbit polyclonal anti Ki-67	1:300	Merck Millipore
rabbit polyclonal anti aquaporine-1	1:500	Merck Millipore
Mouse monoclonal anti CD45	1:100	BD Biosciences
Mouse monoclonal anti-Nestin	1:300	BD Biosciences
Mouse anti rat CD45-V450	1:25	BD Biosciences
Mouse anti rat CD11b-APC	1:100	BD Biosciences
Mouse anti rat CD11b/c-PE-Cy7	1:100	BD Biosciences
Mouse anti rat CD32 (Fcγll receptor)	-	BD Biosciences
Mouse anti rat CD3-BV605	1:200	BD Biosciences
Mouse anti rat RT1B-PE	1:400	Biolegend
Mouse anti CCR2-PE	1:100	R&D Systems

S2 Table

Supplementary table 2. Primer sequences used in the study		
Name	Sequence	
RPL19	Forward	CCAAGGAAGCACGAAAGC
	Reverse	CCTCCTTGGACAGAGTCTTGA
CCL2 (MCP-1)	Forward	CGGCTGGAGAACTACAAGAGA
	Reverse	TCTCTTGAGCTTGGTGACAAATA
CCL3 (MIP1α)	Forward	TCCACGAAAATTCATTGCTG
	Reverse	AGATCTGCCGGTTTCTCTTG
CCL4 (MIP1β)	Forward	CTCTGCGTGTCTGCCTTCT
	Reverse	GTGGGAGGGTCAGAGCCTAT
CCL7	Forward	TGAAGCCAGCCTTCTCTCTC
	Reverse	TGACATAGCAGCAAGTGGATG
CCL12	Forward	CCTTCTTTGCCTTCTGCTCA
	Reverse	GGATCTTCTGCTTAGCGACATT
CCR2	Forward	AAGAAGTATCCAAGAGCTTGATGAG
	Reverse	TCACCATCATCATAGTCATACGG
CCR5	Forward	GAAGGTGAGACATCCGTTCC
	Reverse	TCGACCCTTGAAAATCCATC
TNF-α	Forward	CAAACCACCAAGCAGAGGAG
	Reverse	GTGAGGAGCACATAGTCGGG
IL-6	Forward	AAAGCCAGAGTCATTCAGAGCA
	Reverse	AGGTTTGCCGAGTAGACCTCAT
IL-1β	Forward	TGTGATGAAAGACGGCACAC
	Reverse	CTTCTTCTTTGGGTATTGTTTGG
IL-10	Forward	AGTGGAGCAGGTGAAGAATGA
	Reverse	TCATGGCCTTGTAGACACCTT
r129	Forward	CGGACCTCAGAACGGACATAC
	Reverse	TCTCTGCAGGATAGTTGGATCTTG

II) ARTICLE 2

Doxycycline prevents against cytomegalovirus spreading in the embryonic rat brain and ameliorates associated postnatal phenotypic deterioration

Robin Cloarec, Sylvian Bauer et al.

1. Contexte et but de l'étude

A l'issue de notre première étude, il nous paraissait primordial de préciser le phénotype postnatal de nos animaux infectés *in utero* par le RCMV, en prolongeant les analyses au-delà du stade P1. En parallèle, le rôle joué par les cellules microgliales dans ces infections congénitales restait à préciser. En particulier, dans notre modèle, l'activation microgliale jouait-elle un rôle bénéfique ou au contraire néfaste sur la dissémination cérébrale du RCMV, et dans l'émergence des troubles neurologiques et sensoriels observés chez nos animaux ? Cette étude a eu pour but principal de répondre à cette question, en utilisant des outils pharmacologiques permettant de cibler la population cellulaire d'intérêt.

2. Approche expérimentale

Dans ce deuxième article, nous avons dans un premier temps étudié dans notre modèle différents paramètres cliniques au cours des trois premières semaines postnatales incluant :

- la survie des animaux et leur poids,
- leurs facultés sensorimotrices, évaluées à l'aide des tests de righting reflex et de cliff aversion
- la présence de crises d'épilepsie spontanées
- la présence d'un déficit auditif analysé par l'enregistrement des potentiels évoqués auditifs.

Dans un deuxième temps, nous avons cherché à déterminer le rôle de l'activation microgliale d'une part dans la dissémination cérébrale du RCMV et d'autre part dans l'émergence de ces phénotypes postnataux.

Une première approche pilote a consisté à éliminer sélectivement les cellules phagocytaires cérébrales, par administration ICV de liposomes clodronate ou de liposome PBS chez les animaux infectés par le RCMV à E15.
Dans une deuxième approche, de la doxycycline a été administrée *per os* aux rates gestantes pendant toute la durée de la gestation. L'état d'activation microgliale a ensuite été apprécié par immunohistochimie et cytométrie de flux.

3. Principaux résultats

La déplétion sélective des cellules phagocytaires par les liposomes clodronate ou l'inhibition de l'activation microgliale par la doxycycline chez nos animaux infectés à E15 par le RMCV ont pour conséquences :

- une diminution du nombre de cellules Iba1+, et Iba1+/ED 1+
- une réduction drastique du nombre de cellules infectées au sein du parenchyme cérébral
- une amélioration de la survie des animaux et de leur réussite aux tests sensorimoteurs
- l'absence de correction des déficits auditifs constatés à P40.

Ainsi, nous avons pu mettre en évidence dans ce modèle, à l'aide de deux approches complémentaires, le rôle néfaste joué par l'activation microgliale au cours du développement *in*

Doxycycline throughout pregnancy prevents against postnatal mortality, sensorimotor impairment and epileptic seizures caused by cytomegalovirus infection of the embryonic rat brain

Robin Cloarec[1,2,3]*, Sylvian Bauer [1,2,3]*, Natacha Teissier[4,5,6], Fabienne Schaller[1,2,3,7], Hervé Luche[8,9,10], Manal Salmi[1,2,3], Sandra Courtens[1,2,3], Emilie Bois[4,5,6], Emilie Pallesi-Pocachart[1,2,3,11], Emmanuelle Buhler[1,2,3,7], Pierre Grenot[8,9,10], Homa Adle-Biassette[4,5,6], Pierre Gressens[4,5,6], Marie Malissen[8,9,10], Thomas Stamminger[12], Daniel N. Streblow[13], Nadine Bruneau[1,2,3], Pierre Szepetowski[1,2,3]

*both authors contributed equally to this work

[1]INSERM U901, Marseille, France. [2]Mediterranean Institute of Neurobiology (INMED), Marseille, France. [3]UMR_S901, Aix-Marseille University, Marseille, France. [4]INSERM U1141, Paris, France. [5]Paris Diderot University, Sorbonne Paris Cité, Paris, France. [6]PremUP, Paris, France. [7]PPGI platform, INMED, Marseille, France. [8]CIPHE (Centre d'Immunophénomique), PHENOMIN, UM2 Aix-Marseille University, Marseille, France. [9]INSERM US012, Marseille, France. [10]CNRS UMS3367, Marseille, France. [11]PBMC platform, INMED, Marseille, France. [12]Institute for Clinical and Molecular Virology, University of Erlangen-Nuremberg, Erlangen, Germany. [13]Vaccine & Gene Therapy Institute, Oregon Health and Science University, Portland, OR, USA.

¶To whom correspondence should be addressed: Dr Szepetowski, Institut de Neurobiologie de la Méditerranée (INMED), Inserm U901, Parc Scientifique de Luminy, BP13, 13273 Marseille Cedex 09, France. Phone: +33 (0)4 9182 8111; Fax : +33 (0)4 9182 8101; e-mail: pierre.szepetowski@inserm.fr

Abstract

Congenital CMV infections are a common cause of neurodevelopmental disorders and represent medical, socio-economical and scientific issues. Insights into the pathophysiological mechanisms underlying CMV spreading in the developing brain and the severe neonatal and long-term possible neurological consequences, have long been hampered by the scarcity of comprehensive models recapitulating key aspects of the corresponding human disease. Recently we designed and characterized a rat model of *in utero* CMV infection of the developing brain. In this model, early and prominent modification of the brain immune system, including the infection and activation of microglial cells - the resident mononuclear phagocytes of the brain - were observed. This suggested that microglial cells might play an important pathophysiological role. In the present report, we show that CMV infection of the rat brain *in utero* leads to severe clinical manifestations postnatally, including increased mortality, low weight gain, sensorimotor impairment reminiscent of cerebral palsy, hearing impairment, and epileptic seizures. This recapitulated many features encountered in the corresponding human disease. To address the possible influence of microglia on the emergence of such neurodevelopmental phenotypes, acute administration of clodronate liposomes in the embryonic brains to deplete microglial cells, or maternal feeding with doxycyxline *per os* throughout pregnancy to decrease microglial activation, were used. Significant and dramatic improvements of survival, weight gain, sensorimotor development and seizures were obtained. Altogether these data strongly suggest that microglial activation is a key detrimental event influencing the future neurological outcome of CMV-infected embryos. From this viewpoint, the present study represents a promising proof of concept for the future design of microglia-targeted preventive strategies against the neurological disorders and the other severe manifestations caused by congenital CMV infection of the brain.

Key words: cytomegalovirus; rat; congenital infection; fetal brain; microglia; epilepsy; sensory motor; hearing; doxycycline.
Number of words: 3681
Number of Tables: 1
Number of Figures: 2
Number of Colour Figures: 2
Supplemental Figure: 1

Introduction

Cytomegaloviruses (CMVs) belong to the *Herpesviridae* family. In human, congenital CMV infection can cause a wide variety of severe neurological diseases and defects (Adler and Nigro, 2013). Non exhaustively, this includes microcephaly, polymicrogyria, hearing loss, cerebral palsy, epileptic seizures and intellectual disability - notwithstanding the as-yet elusive long-term influence on the emergence of schizophrenia, autism or epilepsy. Despite the incidence and the medical and socioeconomical burden of such infections, which overall represent about 1% of all live births, the pathophysiological mechanisms underlying those neurodevelopmental disorders in the context of congenital CMV infection has long remained elusive (Cheeran et al., 2009). In the absence of current effective preventive or curative strategies, understanding of pathogenesis is mandatory before strategies for early interventions can be designed and tested. Pathophysiology is inherently multiple and complicated as it involves different stages, from maternal CMV primary infection or reactivation and the associated immune responses, to infection and dissemination within the embryonic developing brain - not to mention the crossing of the placental and blood-brain barriers. Insights into the early events that follow CMV infection of the developing brain are particularly needed. Because of the species-specificity of CMVs, animal models of congenital CMV infection of the developing brain have been designed, notably in rodents (William J. Britt, 2013); (Cekinovic et al., 2014). Despite the lack of materno-fetal transmission of CMV infection in rodents because of differences in placental layer organization, and whereas multiple routes (intracranial, intraperitoneal or intraplacental) and developmental timepoints (antenatal or neonatal) of CMV inoculation were used, convergent insights into the important influence of inflammatory and immune responses have emerged from such studies in the recent years (Kosmac et al., 2013); (Sakao-Suzuki et al., 2014);(Slavuljica et al., 2015).

Recently we reported on a rat model of CMV infection of the developing brain (Cloarec et al., submitted), where frequent detection of rat CMV (RCMV) in microglial cells and early activation of microglia at the sites of active infection, were observed. It was also recently shown that microglia is targeted by CMV in the human congenital disease (Teissier et al., 2014). Our model represented a useful tool to start in addressing the possible pathogenic involvement of microglia in congenital CMV infection of the brain. Microglial cells originate from progenitors located in the yolk sac during embryogenesis (Ginhoux et al., 2010) and represent the resident mononuclear phagocytes of the brain (Ginhoux et al., 2013);(Ginhoux and Jung, 2014); they play crucial role not only in immune defense, maintenance of the neural environment, injury, and repair, but also in neurogenesis, synaptogenesis, synaptic pruning, connectivity, and modulation of synaptic and neuronal activity. On the one hand, early microglial activation might well limit CMV infection; on the other hand, it might also have detrimental effects. In order to clarify this

important issue, we have tested whether the modulation of microglia *in utero* would have an effect on CMV spreading and on possible postnatal consequences.

Results and Discussion

In this study, we evaluated the possible influence of microglia on the emergence of neurodevelopmental disorders caused by CMV infection of the developing brain. To this aim, we first designed a series of clinical evaluations to see whether RCMV infection and spreading in the developing rat brain, and the accompanying brain-specific immune responses (Cloarec et al. submitted), would actually have postnatal consequences similar to those seen in the corresponding human pathology. Recombinant RCMV expressing green fluorescent protein (GFP) was injected intraventricularly (icv) as done before (Cloarec et al. submitted) in embryos from timed pregnant rats (embryonic day 15, E15). The neurological and overall clinical outcome of newborn rats was then evaluated on a daily basis to determine the postnatal effects of RCMV infection *in utero*. CMV infection significantly decreased postnatal survival as compared to control animals (injection of vehicle - MEM - icv at E15) ($p < 10^{-4}$, log rank test), with death starting at P2 and occurring gradually until P20, where only 30% of CMV-infected living neonates had survived (Figure 1A; Table 1). In contrast, no significant difference was observed in the ratio of live animals at birth (72.8 %, n = 103 CMV-infected embryos) as compared with control situation (68.5 %, n = 54 injected embryos; p = 0.58, Fisher's exact test, two-tailed). Significant difference (two-way ANOVA followed by Tukey post test) in body weight gain was also observed after RCMV infection *in utero* (Figure 1B). Congenital CMV infection is well known to be a contributing cause of cerebral palsy, a group of disorders involving variable degree of sensorimotor disabilities (Colver et al., 2014). To evaluate the development of sensorimotor function, rat pups were monitored daily between P1 and P20 for the acquisition of the classic developmental sensorimotor righting reflex and cliff aversion reflex (Rousset et al., 2013). Whereas performances of the righting reflex clearly improved between P1 and P4 in all animals regardless of their injection status (CMV or MEM), a marked and significant (two-way ANOVA followed by Tukey post test) deterioration occurred as from P5 in the CMV-infected group as compared to the control group (Figure 1C; Table 1). Similarly, CMV-infected rats performed significantly (two-way ANOVA followed by Tukey post test) worse to the cliff aversion test from P4 to P10 as compared with controls; most animals were even unable to complete the test (Figure 1D; Table 1). Failure at this test was often associated with the existence of hindlimb paralysis, likely preventing animals from turning away from the cliff; in significant (two-way ANOVA followed by Tukey post test) contrast, hindlimb paralysis was not observed in any control pup (Figure 1E; Table 1). Patients with human congenital CMV infection are also at high risk to postnatal epileptic seizures (Suzuki et al., 2008). A significant proportion (two-way ANOVA followed by Tukey post test) of CMV-infected pups also exhibited generalized tonic-clonic seizures (*e.g.* 8/24 at P11 and 4/22 at P13), whereas no MEM-injected pup showed any seizure

any day. When the daily proportions of animals with seizures between P7 and P15 were taken together, they also differed significantly in the CMV group *vs* the control group (Kruskall-Wallis test followed by Dunn's post test) (Figure 1F; Table 1). Congenital CMV infection is also the leading cause of non-hereditary congenital sensorineural hearing loss (Smith et al., 2005). Auditory tests were performed in a subset of CMV-infected rats and in control animals at P40. Hearing thresholds were significantly higher for clicks and for 24 kHz bursts ($p = 0.0146$ and $p = 0.0017$, respectively; Kruskall Wallis test followed by Dunn's post test) in the RCMV group than in the control group (Figure 1G), indicating hearing impairment in the RCMV group. The existence of a significant deterioration of hearing thresholds between P40 and P60 in control (MEM) rats (data not shown) precluded accurate hearing evaluation at later age in CMV-infected rats; indeed, hearing loss has already been reported in old Wistar rats (Alvarado et al., 2014).

Increased lethality, early-onset epileptic seizures, cerebral palsy, and hearing impairment, are all classically seen in newborns and infants infected *in utero* with CMV. Hence the clinical consequences of RCMV infection as described just above, recapitulated four cardinal clinical features of the human pathology. The early and prominent modification of brain phagocytes (microglial cells and macrophages) upon RCMV infection of the developing rat brain (Cloarec et al. submitted), suggested that they might be important players in the pathophysiology of congenital CMV infection. This made it our model very appropriate to start in addressing the actual role of these cells in the emergence of those various phenotypes. To this aim, we decided to set up a first series of experiments where brain phagocytes are being depleted with clodronate liposomes. Under such a treatment, clodronate is released into the cytosol after engulfment of the liposomes by the phagocytes, ultimately leading to cell death. Indeed, clodronate liposomes co-injected icv together with RCMV at E15 led to a significant decrease at P1, in the total number of $Iba1^+$ cells (microglia and macrophages) ($p = 0.005$, Mann-Whitney test, two-tailed, Bonferroni correction) and in their activation status (proportion of $Cd68/Ed1^+$, $Iba1^+$ activated cells) ($p = 0.0022$, Mann-Whitney test, two-tailed, Bonferroni correction), as compared with the control situation where liposomes containing phosphate buffer solution (PBS) only, were co-injected with RCMV (Supplemental Figure 1A). Depletion in brain phagocytes was associated with a dramatic reduction of RCMV spreading in the developing brain: GFP^+ infected cells were barely detected at P1 within the brains of treated embryos, as further quantified by measuring the percentage of fluorescent area over the whole brains ($p = 0.0006$, Mann-Whitney test, two-tailed) (Supplemental Figure 1B). Altogether these data indicated that RCMV infection and spreading in the rat developing brain was somehow paradoxically favored, rather than combated, by brain phagocytes. Importantly, this was accompanied with a significant reduction in early postnatal mortality ($p = 0.024$, log rank test) and with a significant improvement of sensorimotor impairment at P9 (righting reflex: $p = 0.0032$; cliff aversion test: $p = 0.0024$; Mann-Whitney test, two-tailed)

(Supplemental Figure 1C). Hence the depletion of brain phagocytes *in utero* reduced RCMV infection, and restored postnatal survival and motricity at least until P9.

Based on those first data and as microglial cells showed early increased activation upon RCMV infection of the brain (Cloarec et al., submitted), we decided to test the possible influence of the activated state of microglia. Doxycycline is a second-generation, lipophilic tetracycline that crosses blood-brain and placental barriers and that inhibits microglial activation independently of its canonical antibacterial action. It was previously shown that doxycycline efficiently reduces the proportion of activated microglia in rat pups' brains after chronic maternal administration during pregnancy (Cunningham et al., 2013). In the present study, doxycycline was administrated *per os* to pregnant dams from E0 to birth. Immunohistochemistry experiments demonstrated that upon maternal feeding with doxycycline, the number of $Iba1^+$ cells ($p = 0.022$, Mann Whitney test, two-tailed, Bonferroni correction) and the proportion of activated ($Cd68/Ed1^+$, $Iba1^+$) cells ($p = 0.0152$, Mann Whitney test, two-tailed, Bonferroni correction), actually decreased significantly at the sites of active infection in P1 pups subjected to RCMV injection icv at E15, as compared with untreated RCMV-infected pups (Figure 2A). Flow cytometry analyzes on whole brain $CD45^+$ hematopoietic cells confirmed the decreased proportion of activated microglial cells ($CD45^{low/int}$, $CD11b/c^+$, $RT1B^+$) in doxycycline-treated, RCMV-infected pups at P1 as compared with untreated infected pups ($p = 0.0496$; Kruskall Wallis test followed by Dunn's post test) (Figure 2B). Importantly, the number of RCMV-infected microglial cells (GFP^+, $Iba1^+$) also decreased significantly ($p = 0.02$, Mann Whitney test, two-tailed) (Figure 2A). Hence maternal doxycycline administration during pregnancy not only led to decreased activated state of microglia in the progeny as expected and previously described (Cunningham et al., 2013), but also to decreased CMV infection of the developing brain. Although the participation of other biological effects of doxyxycline cannot be excluded (Yrjanheikki et al., 1999), these data coupled with the efficacy of clodronate liposomes as mentioned above, indicated that microglia, and its activated status notably, were very likely to play detrimental role in RCMV infection and spreading in the developing brain.

All this prompted us to test whether maternal administration of doxycycline would also have postnatal effects on the clinical outcome of RCMV-infected embryos. Indeed, survival rates from P0 to P20 postnatal stages increased dramatically in infected pups from doxycycline-treated dams as compared with infected pups from untreated dams ($p < 10^{-4}$, log rank test), and reached values similar as in non-infected, control pups ($p > 0.05$, log rank test) (Figure 1A ; Table 1). Significant improvement (two-way ANOVA followed by Tukey post test) in body weight gain was also observed after doxycycline treatment *in utero* (Figure 1B). Also, responses to sensorimotor tests (righting and cliff aversion reflexes) improved dramatically in infected pups treated *in utero* (two-way ANOVA followed by Tukey post test) (Figures 1C, 1D ; Table 1);

in parallel, hindlimb paralysis was observed less frequently (two-way ANOVA) (Figure 1E, Table 1). Similarly, the proportion of infected pups experiencing generalized tonic-clonic seizures decreased significantly in the CMV+DOX group, and was not significantly different from control (MEM) group (two-way ANOVA followed by Tukey post test) (Figure 1F ; Table 1); consistently, when all daily proportions of animals with seizures were considered between P7 and P15, the CMV+DOX group differed significantly from the CMV group, and was not significantly different from the control (MEM) group of non-infected pups (Kruskall-Wallis test followed by Dunn's post test). In contrast with the improvement of the aforementioned clinical manifestations, no rescue was observed in hearing evaluation after doxycycline treatment (Figure 1G); doxycycline might not reach the inner ear accurately, or hearing deterioration might not depend on microglial activation.

Administration of doxycycline to the mother during pregnancy, led to decreased microglial activation and to a dramatic improvement in survival and in the sensorimotor and epileptic disorders caused by CMV infection of the brain *in utero*. This indicates that microglial activation is a key event strongly influencing the future neurological outcome of CMV-infected embryos. This is indeed consistent with the increasingly recognized crucial role of microglia in the control of proper development and maturation of the brain and in various pathological conditions (Prinz and Priller, 2014). Microglial nodules and infected microglial cells were detected in human fetal brains infected with CMV (Teissier et al., 2014): although extrapolation from rodent models to the corresponding human pathology should be taken with caution, it is tempting to speculate that microglia might also play an important role in human congenital CMV infections. Generally microglia represents a promising target for various pathological conditions of the brain (Ponomarev et al., 2011); (Cartier et al., 2014), and strategies directed towards the immune system have already been proposed with the use of corticosteroids in a mouse model of neonatal CMV infection (Kosmac et al., 2013) and with the administration of immunoglobulins in human CMV congenital infection (Nigro and Adler, 2013). Risk reduction of fetal infection and subsequent disease still remains a crucial issue (Hamilton et al., 2014). Early pharmacological interventions *in utero* have already been challenged in other neurodevelopmental models of motor impairment (Yamada et al. 2009) and of epilepsy (Salmi et al., 2013). From this viewpoint, the present study represents a promising proof of concept for the future design of relevant microglia-targeted strategies to prevent early against the severe neurological outcome of congenital CMV infection of the brain.

Material and methods

Ethical statement

Animal experimentations were performed in accordance with the French legislation and in compliance with the European Communities Council Directives (2010/63/UE). Depending on the age of the animals, euthanasia were performed after anesthesia with 4% isoflurane with overdose of pentobarbital (120mg/kg) or with decapitation. All surgical procedures were done under anesthesia and all efforts were made to reduce suffering. *In utero* injections were performed in embryos from timed pregnant rats (embryonic Day 15, E15) that were anaesthetized with ketamine (100 mg/kg) / xylazine (10 mg/kg). This study was approved under the French department of agriculture and the local veterinary authorities by the Animal Experimentation Ethics Committee (*Comité d'Ethique en Expérimentation Animale)* n°14 under licence n°01010.02.

RCMV infection and pharmacological treatments

Wistar rats (Janvier Labs, France) were raised and mated at the INMED Post Genomic Platform (PPGI) animal facility and kept at room temperature under conditions of optimal health hygiene. The rat cytomegalovirus (RCMV) recombinant Maastricht strain (RCMV-Δ145-147-gfp) with a green fluorescent protein (GFP) expression cassette, and its production, purification and titration, were reported previously (Baca Jones et al., 2009); Cloarec et al., submitted). *In utero* injections were performed as previously described (Salmi et al., 2013) in embryos from timed pregnant rats (embryonic Day 15, E15) that were anaesthetized with ketamine (100 mg/kg) / xylazine (10 mg/kg). In each embryo, 1 µl of minimal essential medium (MEM) with Fast Green (2 mg/ml; Sigma) and 5% fetal calf serum, either containing 3.5 10^3 plaque forming unit (pfu) of RCMV, or not (control), was injected icv *via* pulled glass capillaries and a microinjector (Picospritzer II; General Valve Corp., Fairfield, NJ). For the depletion of brain phagocytes, clodronate liposomes (2.5 µg/injection icv, Encapsula Nanosciences, Nashville, TN, USA) were co-injected with RCMV icv; alternatively, phosphate buffer saline (PBS) was co-injected as a control. Microglial activation was inhibited in the embryos *in vivo* with doxycycline *per os* given to the mother all along pregnancy (200 mg/kg in food pellet chow, Bioserv).

Immunohistochemistry experiments

Immunohistochemistry experiments were carried out as described previously (Cloarec et al., submitted) on coronal brain slices (50-100 µm, vibratome, Microm; 14 µm, cryostat, Leica) with the following primary (anti-Iba1: 1/500, Wako; anti-Cd68, clone Ed1: 1/200, Millipore) and secondary (Alexa Fluor_568 or 647-conjugated goat anti-rabbit or anti-mouse IgGs; Life

Technologies) antibodies. Hoescht 33258 (1:2000, Sigma) was used for nuclei staining.

Microscopy and cell counting

Images were acquired by using a Stereo Microscope Olympus SZX16 equipped with digital camera DP73, or a Zeiss Axio Imager Z2 microscope with structured illumination (ApoTome) equipped with Zeiss AxioCam MRm camera and processed using Axiovision software, or with a confocal laser scanning microscope Leica TCS SP5 equipped with a CoolSNAP camera. For cell counting analyses, at least three adjacent brain sections were analyzed throughout the entire z-dimension for each sample. Images were acquired using the 40x oil-immersion objective and cells were counted in each brain with Cell Profiler cell image analysis software (Broad Institute Cambridge, MA, USA) at P1. Fluorescence of infected areas was quantified using ImageJ software. Activation index of microglia in a given region of interest (ROI) was defined as the ratio between the number of $Iba1^+$, $Ed1^+$ cells and the total number of $Iba1^+$ cells.

Flow cytometry

For dissociation into single cell suspension, entire control (MEM-injected) or RCMV-infected (treated or not with doxycycline during pregnancy) brain tissues obtained from anesthetized P1 pups, and perfused with 2-3 mL of phosphate-buffered saline (PBS), were mechanically homogenized in ice-cold Hank's buffer. Brain homogenates were centrifuged through a continuous 30% Percoll gradient (7750 g, 40 min.) and the bottom phase containing leukocytes was filtered using cell strainers (70 µm). Cells collected in ice-cold Hank's buffer were centrifuged (600g, 5 min.) and suspended in FACS buffer (D-PBS 0.01 M pH 7.4, EDTA 1 mM, BSA 1%). 1 to 3 $x10^6$ cells were then incubated with Zombie NIR Fixable Viability kit (1:200; Biolegend) for 20 min at room temperature to discriminate between live and dead cells. Fc receptor were blocked using with mouse anti-rat CD32 antibody (FcγII receptor clone D34-485) for 10 min. at 4°C to prevent against nonspecific binding. Cells were then stained with antibodies against combinations of cell surface markers as previously described (Cloarec et al. submitted) in PBS 1% FCS 2 mM EDTA for 45 min. at 4°C, washed twice in FACS buffer, and finally incubated in FACS buffer containg 2% (v/v) PFA. An average of 1.3 $x10^5$ living singlet cells were analyzed per brain equivalent on a BD LSRFortessa (BD Bioscience) cell cytometer and raw data were analyzed using FACSDiva V8.0 software (BD Biosciences).

Phenotyping

Acquisition of classical developmental reflexes (righting reflex and cliff aversion reflex) was monitored daily between P1 and P20. For righting reflex evaluation, rat pups were placed in a

supine position, and the time required to flip to the prone position was measured. For the cliff aversion reflex, animals were placed with their forepaws overhanging the edge of a board; the time required to turn >90° away form the edge was recorded. For both tests, a maximum observation time of 30 sec. was used; in case the pup did not succeed in performing the test within the allotted time, the maximal time of 30 sec. was assigned. A subset of the animals also exhibited hindlimb paralysis and/or epileptic seizures. Hindlimb paralysis was determined visually in animals that had a postural misplacement and immobility of their hindlimbs. Generalized tonic-clonic epileptic seizures were frequent after animal handling, especially during cage changing and behavioral testing. The seizures consisted in a behavioral sequence including (i) movement arrest and loss of postural equilibrium (ii) hypertonic posture of the trunk, limbs and tail, symmetrically, and (iii) repeated, large clonic movements of all limbs, often with respiratory arrest, incontinence, motor automatisms such as chewing and grooming, terminated by a catatonic phase. For auditory experiments, four needle electrodes were placed subcutaneously under isoflurane anesthesia (flow: 1,5 L/min). For each rat, the reference electrode was inserted beneath the pinna of the assessed ear, the positive electrode beneath the skin on the vertex of the head, the ground electrode on the animal's back. Evoked potentials were performed using the Echodia® apparatus and the RTlab software. Headphones with appropriate earplugs were used as acoustic transducers. Clicks, 12 kHz and 24 kHz tone bursts were delivered at a frequency of 17 Hz. Filters were set at 150-1500 Hz. Rejection threshold was defined at 20 μV. Impedances were monitored to be below 2000 Ω. Responses for 250 sweeps were averaged at each intensity level. The stimulus intensity was decreased by 10 dB steps sound pressure level (SPL) alternating right and left ears. A contralateral auditory masking was used for high intensity stimulations (> 45 dB). Thresholds were defined as the lowest level at which a reproducible wave IV response could be obtained; the curves were analyzed by two different researchers, of whom one was blinded to the study. Profound hearing loss and cophosis were defined by the absence of reproducible wave IV at 90dB (at 80dB for the 12 kHz tone bursts); if no threshold was identified at 90 dB, the recording was repeated on the following day to exclude any technical problem. For statistics' sake, these thresholds were set at 100 dB.

Statistics

Data were expressed as means ± s.e.m. unless otherwise stated. Nonparametric Kruskall-Wallis testing was used to detect heterogeneous distribution between groups wherever appropriate, and was followed by Dunn's post test for multiple comparisons. Mann Whitney test, two-tailed, was also used. Two-way ANOVA followed by Tukey post test was used for the clinical comparison of the three groups of animals wherever appropriate. The log rank test was used to compare between survival distributions. Fisher's exact test (two-tailed), with Bonferroni

correction whenever needed. Chi-square test was used to verify the lack of any significant difference in sex ratio between the different groups of animals.

Author contributions

R.C. and S.B. performed most experiments and data analyzes with equal contribution. N.T. supervised, performed and validated auditory tests. F.S. performed most *in utero* injections. H.L. supervised and analyzed flow cytometry analyzes. M.S. performed a subset of immunohistochemistry, confocal microscopy and image analyzes, and participated in experiments with clodronate liposomes at the initial stages of the project. S.C performed a subset of immunohistochemistry experiments, confocal microscopy and image analyzes. E.B. performed and analyzed auditory tests. P.Gren. helped in flow cytometry experiments. H.A.-B. and P.Gres. participated in the follow-up of the project and in inner ear analyzes. E.B. supervised *in utero* injections. M.M. provided strong scientific support and advices on flow cytometry analyzes and interpretation. T.S. and D.S. provided and purified the RCMV strain and provided strong expertise in virology. N.B. provided strong scientific support and advices all along the duration of the project. P.S. was the project leader. He decided on the overall strategy, directed the follow-up of experiments, supervised data analysis and wrote the manuscript with help of R.C., S.B., and N.B. All authors contributed the final version of the manuscript.

Acknowledgments

We thank F. Michel at inMAGIC (INMED Imaging Centre), F. Bader and S. Corby (INMED animal core facilities), H Child (Oxford University, UK) for his help as a trainee *via* the BIOTRAIL international student exchange program, and all the administrative staff at INMED. We also thank R. Charrel (EPV UMR_D190, Aix-Marseille University, France) for his advices at the onset of the project, and C. Sapet and O. Zelphati at OZ Biosciences (Marseille, France) for their kind help and support. This work was supported by INSERM (Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale), by FRM (Fondation pour la Recherche Médicale) grant ("Physiology and pathology of brain development", call 2012), and by the PACA (Provence-Alpes-Côte d'Azur) Regional Council. RC has been a recipient of an INSERM/PACA PhD fellowship and is a recipient of a FRM PhD fellowship (FDT20140930813). TS was supported by the Deutsche Forschungsgemeinschaft (SFB796).

Conflict of interest statement

The authors declare no conflict of interest

Figures

Figure 1. Altered survival, decreased weight gain, sensorimotor impairment, and epileptic seizures caused by CMV infection of the embryonic rat brain, are prevented by maternal feeding with doxycycline.

A series of clinical investigations (see also Table 1) was undertaken as from birth in three groups of rat pups previously subjected to either of the following procedures during pregnancy: injection of minimal essential medium (MEM) intraventricularly (icv) at embryonic day 15 (E15) for the control group (MEM; n = 34 from four litters); injection of rat CMV (RCMV) ($3.5\ 10^3$ plaque forming unit, pfu) icv for the untreated, infected pups (CMV; n = 54 from six litters); or injection of RCMV ($3.5\ 10^3$ plaque forming unit) icv in pregnant rat fed with doxycycline *per os* all over pregnancy for the doxycycline-treated, infected pups (CMV+DOX; n = 36 from four litters). Sex ratio did not differ significantly between the three groups at birth (p = 0.47, Chi-square test).

(A) Survival rates as estimated on a daily basis from birth to P20, showed significant decrease in CMV group as compared with MEM group. Significant rescue was obtained in the CMV+DOX group. Log rank test was used to compare the three survival curves. No significant difference in overall survival rates was observed between males and females in the CMV group (p = 0.92, Chi-square test). ***: $p < 0.001$; ns: not significant. (B) Weight gain as estimated on a daily basis from birth to P20, decreased significantly in CMV *vs* MEM group. Significant improvement was obtained in the CMV+DOX group. Note that between P16 and P20, doxycycline-treated rats weighted even significantly higher than control (MEM) rats. Two-way ANOVA test: ***: $p < 0.001$; **: $p < 0.01$; *: $p < 0.05$; ns: not significant. (C, D) Times to perform the righting reflex (C) and the cliff aversion reflex (D) sensorimotor developmental tests increased significantly in CMV group *vs* MEM group and improved significantly in CMV+DOX group *vs* CMV group. Two-way ANOVA tests: ***: $p < 0.001$; **: $p < 0.01$; *: $p < 0.05$; ns: not significant. (E) Increased proportion of hindlimb paralysis was observed in CMV *vs* MEM group. Hindlimb paralysis was rescued in the CMV+DOX group, which showed no difference with the MEM group. Two-way ANOVA tests: **: $p < 0.01$; *: $p < 0.05$; ns: not significant. (F) Generalized tonic-clonic epileptic seizures occurred in a significantly higher proportion of rat pups in the CMV group *vs* MEM group. Doxycycline (CMV+DOX) prevented significantly against seizures. Two-way ANOVA test: ***: $p < 0.001$; *: $p < 0.05$; ns: not significant. (G, H, I) For auditory experiments, evoked potentials were performed at P40 in three groups of rats that showed no significant difference in sex ratio (p = 0.37, Chi-square test). Clicks (G), 12 kHz (H) and 24 kHz (I) tone bursts were delivered and hearing thresholds (decibels, dB) were determined. The CMV group (n = 11 from four litters) showed significantly higher thresholds for clicks (G) and at 24 kHz (I) as compared with MEM group (n = 12 from two litters). Doxycycline (CMV+DOX

group, n = 25 from five litters) did not rescue hearing impairment. Kruskall Wallis test followed by Dunn's post test: ***: $p < 0.001$; **: $p < 0.01$; *: $p < 0.05$; ns: not significant.

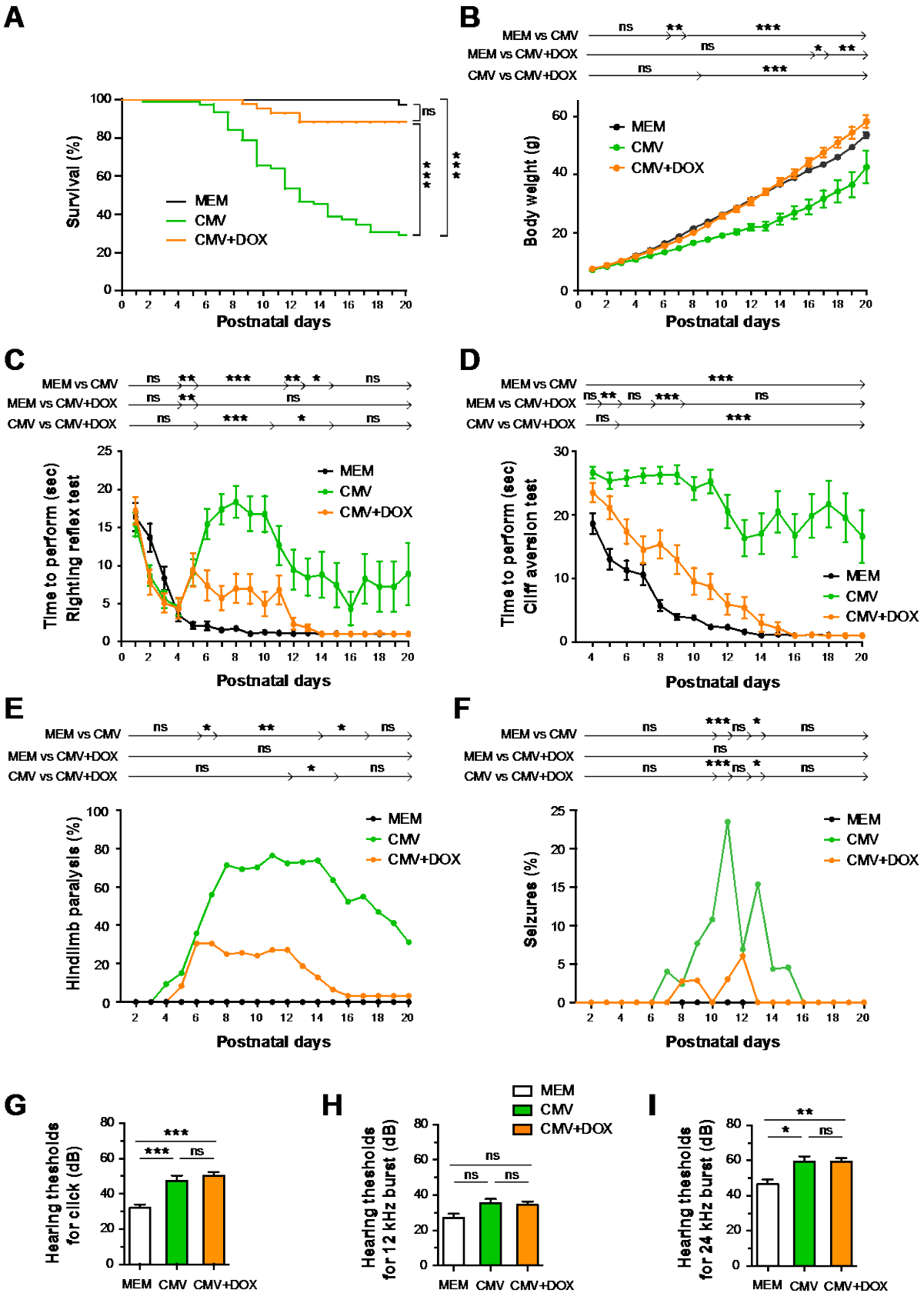
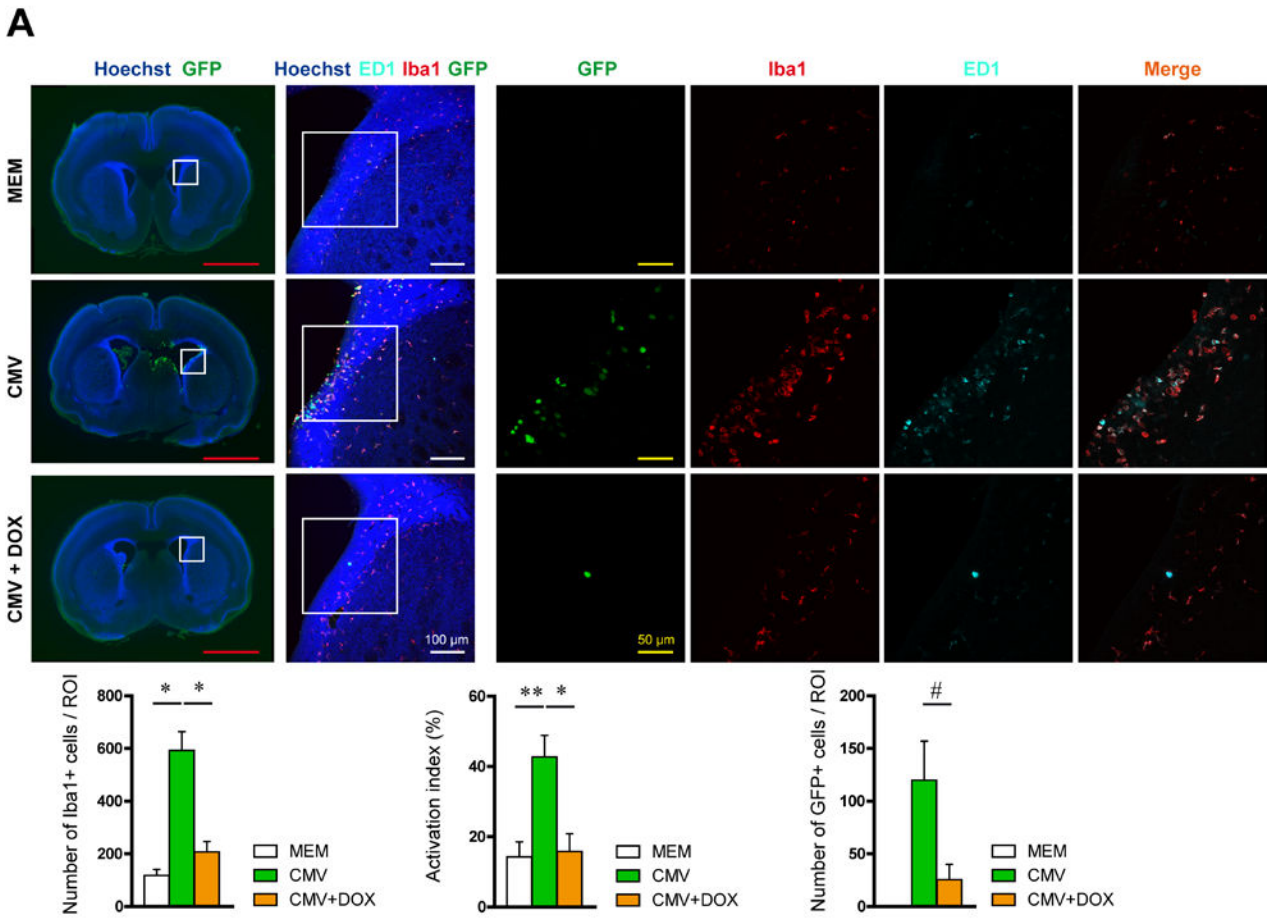


Figure 2. The activation of microglia triggered by CMV infection of the embryonic rat brain is inhibited by maternal feeding with doxycycline.

(A) The activation status of microglia/macrophages of lateral ventricles was assessed by immunohistological experiments on coronal sections observed by confocal microscopy at P1 in MEM-injected (control; n = six brains) or in RCMV-infected, with (CMV + Doxy; n = six brains) or without (CMV; n = six brains) doxycycline treatment. The increases in the number of $Iba1^+$ cells (red) and in their activation status ($Cd68/Ed1^+$, cyan) seen upon CMV infection (green fluorescent protein, GFP), were inhibited in doxycycline-treated rats. Activation index was calculated as the ratio of the number of $Iba1^+$, $Ed1^+$ activated cells versus total number of $Iba1^+$ cells. Morphology index was calculated as the ratio of the number of amoeboid activated, $Iba1^+$ cells versus total number of $Iba1^+$ cells. The number of infected (GFP^+) cells also decreased significantly after doxycycline treatment *in utero*. MEM: minimum essential medium. CMV: cytomegalovirus. ROI: region of interest (387x200 μm^2). Red bar: 2 mm; white bar: 100 µm; yellow bar: 50 µm. Mann Whitney test, two-tailed, with (number of $Iba1^+$ cells, activation index) or without (number of GFP^+ cells) Bonferroni correction. **: $p < 0.005$; *: $p < 0.025$; #: $p < 0.05$;

(B) Flow cytometry analysis of leukocytes collected at P1. Total leukocytes (CD45 events) were gated for CD45 and Cd11b/c, thus defining fractions I (lymphocytic cells), II (myelo-monocytic cells) and III (resident microglial cells). Fraction III corresponding to $CD45^{low/int}$, $CD11b/c^+$ microglial cells was further characterized for RT1B expression to identify activated microglia ($RT1B^+$). Representative flow cytometry plots in control (MEM-injected) brains (n = 6) and in untreated (CMV; n = 11) and doxycycline-treated (CMV + Doxy; n = 13) brains are shown. The increased proportion of activated microglia triggered by RCMV infection was significantly counteracted after doxycycline treatment *in utero*. Kruskall Wallis test followed by Dunn's post test. ***: $p < 0.001$;**: $p < 0.01$; *: $p < 0.05$.

Figure 2


A
Hoechst GFP
Hoechst ED1 Iba1 GFP
GFP
Iba1
ED1
Merge
MEM
CMV
CMV + DOX
100 µm
50 µm
Number of Iba1+ cells / ROI
Activation index (%)
Number of GFP+ cells / ROI
MEM
CMV
CMV+DOX

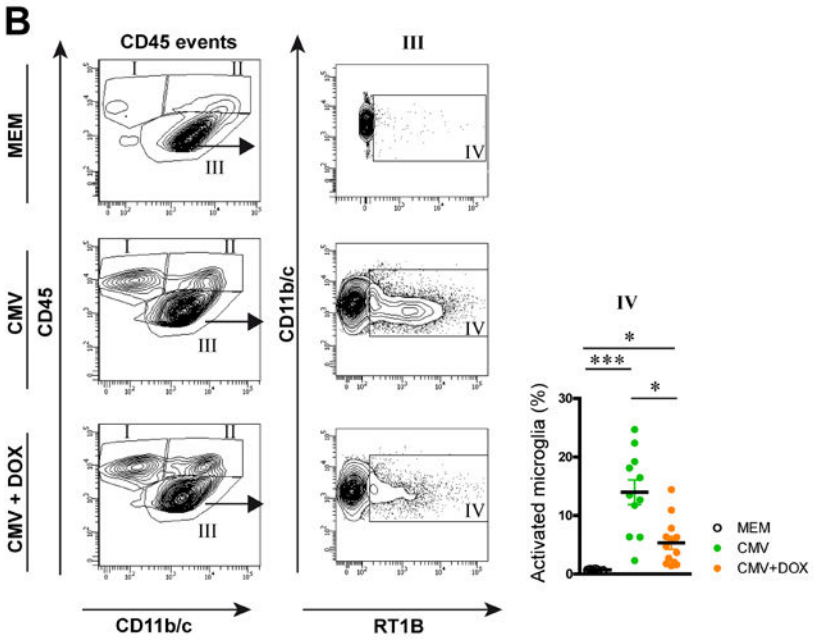
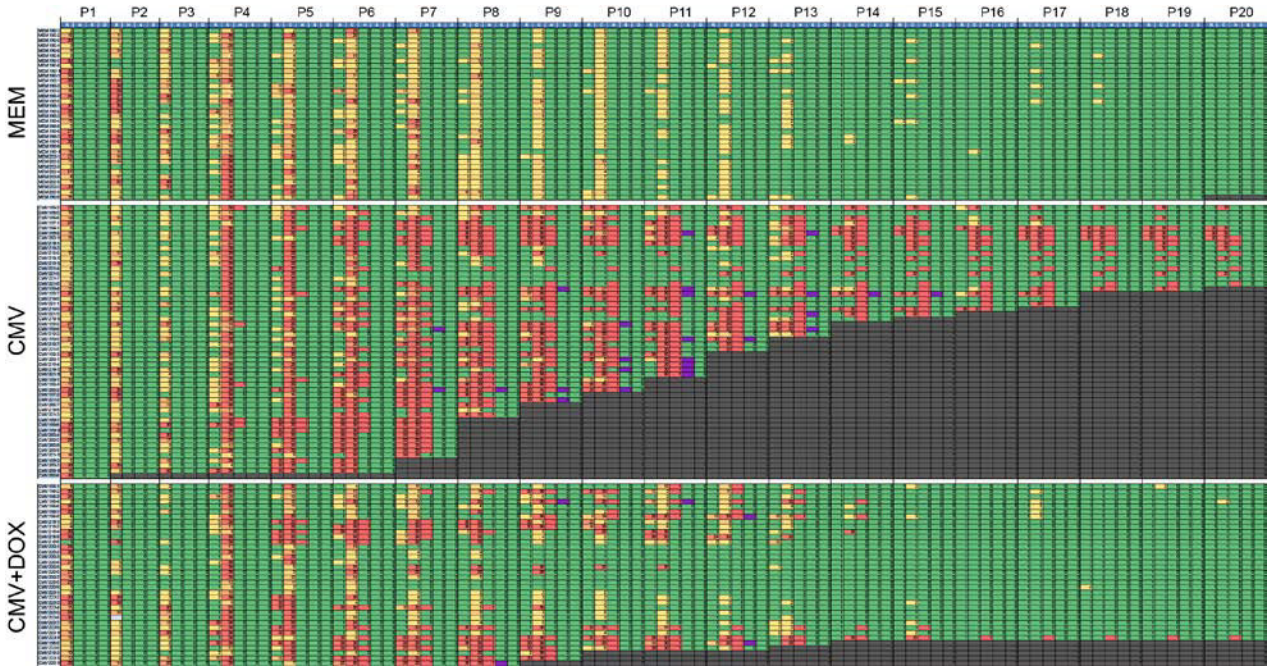

B
CD45 events
III
IV
MEM
CMV
CMV + DOX
CD45
CD11b/c
RT1B
Activated microglia (%)
MEM
CMV
CMV+DOX

Table 1. Overview of clinical assessment.

Color-encoded overview of postnatal test evaluations and observations performed between postnatal days P1 and P20 (see also Figure 1). Three experimental cohorts of rats were analyzed postnatally: i/ control embryos were injected intraventricularly (icv) with vehicle at E15 (MEM; top of table; n = 34 from four litters); ii/ embryos were injected icv with RCMV at E15 and were born from dams fed with control chow all over pregnancy (CMV; middle of table; n = 54 from six litters); iii/ embryos were injected icv with RCMV at E15 and were born from dams fed with doxycycline-supplemented chow all over pregnancy (CMV+DOX; bottom of table; n = 36 from four litters). The table shows color-encoded results for each individual pup evaluated on a daily basis (P1 to P20 columns) for four to five parameters as detailed below. Performances at the righting (R sub-column) and cliff aversion (C sub-column) reflexes were measured from P1 or from P4 to P20, respectively; the data expressed as the time (in seconds, sec.) required to right (R) or to turn away from the cliff (C) were color-encoded by a green-to-red continuous gradient reflecting better-to-worse performances (from 1 to 30 sec.). Each pup was also monitored daily for the appearance of hindlimb paralysis (H sub-column) and of generalized tonic-clonic seizures (S sub-column); the data were color-encoded following a binary rule where green reflected the absence of either event, whereas red or purple indicated the occurrence of paralysis or seizure, respectively. When pups were found dead, this was also annotated on the table and color-encoded in dark grey.



References

Adler SP, Nigro G (2013) Prevention of maternal-fetal transmission of cytomegalovirus. Clin Infect Dis 57 Suppl 4:S189-192.

Alvarado JC, Fuentes-Santamaria V, Gabaldon-Ull MC, Blanco JL, Juiz JM (2014) Wistar rats: a forgotten model of age-related hearing loss. Front Aging Neurosci 6:29.

Baca Jones CC, Kreklywich CN, Messaoudi I, Vomaske J, McCartney E, Orloff SL, Nelson JA, Streblow DN (2009) Rat cytomegalovirus infection depletes MHC II in bone marrow derived dendritic cells. Virology 388:78-90.

Cartier N, Lewis CA, Zhang R, Rossi FM (2014) The role of microglia in human disease: therapeutic tool or target? Acta Neuropathol 128:363-380.

Cekinovic D, Lisnic VJ, Jonjic S (2014) Rodent models of congenital cytomegalovirus infection. Methods in molecular biology 1119:289-310.

Cheeran MC, Lokensgard JR, Schleiss MR (2009) Neuropathogenesis of congenital cytomegalovirus infection: disease mechanisms and prospects for intervention. Clinical microbiology reviews 22:99-126, Table of Contents.

Colver A, Fairhurst C, Pharoah PO (2014) Cerebral palsy. Lancet 383:1240-1249.

Cunningham RL, Lumia AR, McGinnis MY (2013) Androgenic anabolic steroid exposure during adolescence: ramifications for brain development and behavior. Hormones and behavior 64:350-356.

Ginhoux F, Greter M, Leboeuf M, Nandi S, See P, Gokhan S, Mehler MF, Conway SJ, Ng LG, Stanley ER, Samokhvalov IM, Merad M (2010) Fate mapping analysis reveals that adult microglia derive from primitive macrophages. Science 330:841-845.

Ginhoux F, Jung S (2014) Monocytes and macrophages: developmental pathways and tissue homeostasis. Nat Rev Immunol 14:392-404.

Ginhoux F, Lim S, Hoeffel G, Low D, Huber T (2013) Origin and differentiation of microglia. Front Cell Neurosci 7:45.

Hamilton ST, Milbradt J, Marschall M, Rawlinson WD (2014) Human cytomegalovirus replication is strictly inhibited by siRNAs targeting UL54, UL97 or UL122/123 gene transcripts. PLoS One 9:e97231.

Kosmac K, Bantug GR, Pugel EP, Cekinovic D, Jonjic S, Britt WJ (2013) Glucocorticoid treatment of MCMV infected newborn mice attenuates CNS inflammation and limits deficits in cerebellar development. PLoS Pathog 9:e1003200.

Nigro G, Adler SP (2013) Hyperimmunoglobulin for prevention of congenital cytomegalovirus disease. Clin Infect Dis 57 Suppl 4:S193-195.

Ponomarev ED, Veremeyko T, Barteneva N, Krichevsky AM, Weiner HL (2011) MicroRNA-124 promotes microglia quiescence and suppresses EAE by deactivating macrophages via the C/EBP-alpha-PU.1 pathway. Nat Med 17:64-70.

Prinz M, Priller J (2014) Microglia and brain macrophages in the molecular age: from origin to neuropsychiatric disease. Nat Rev Neurosci 15:300-312.

Rousset CI, Kassem J, Aubert A, Planchenault D, Gressens P, Chalon S, Belzung C, Saliba E (2013) Maternal exposure to lipopolysaccharide leads to transient motor dysfunction in neonatal rats. Dev Neurosci 35:172-181.

Sakao-Suzuki M, Kawasaki H, Akamatsu T, Meguro S, Miyajima H, Iwashita T, Tsutsui Y, Inoue N, Kosugi I (2014) Aberrant fetal macrophage/microglial reactions to cytomegalovirus infection. Annals of clinical and translational neurology 1:570-588.

Salmi M, Bruneau N, Cillario J, Lozovaya N, Massacrier A, Buhler E, Cloarec R, Tsintsadze T, Watrin F, Tsintsadze V, Zimmer C, Villard C, Lafitte D, Cardoso C, Bao L, Lesca G, Rudolf G, Muscatelli F, Pauly V, Khalilov I, Durbec P, Ben-Ari Y, Burnashev N, Represa A, Szepetowski P (2013) Tubacin prevents neuronal migration defects and epileptic activity caused by rat Srpx2 silencing in utero. Brain 136:2457-2473.

Slavuljica I, Kvestak D, Huszthy PC, Kosmac K, Britt WJ, Jonjic S (2015) Immunobiology of congenital cytomegalovirus infection of the central nervous system-the murine cytomegalovirus model. Cell Mol Immunol 12:180-191.

Smith RJ, Bale JF, Jr., White KR (2005) Sensorineural hearing loss in children. Lancet 365:879-890.

Suzuki Y, Toribe Y, Mogami Y, Yanagihara K, Nishikawa M (2008) Epilepsy in patients with congenital cytomegalovirus infection. Brain Dev 30:420-424.

Teissier N, Fallet-Bianco C, Delezoide AL, Laquerriere A, Marcorelles P, Khung-Savatovsky S, Nardelli J, Cipriani S, Csaba Z, Picone O, Golden JA, Van Den Abbeele T, Gressens P, Adle-Biassette H (2014) Cytomegalovirus-induced brain malformations in fetuses. Journal of neuropathology and experimental neurology 73:143-158.

William J. Britt DCaSJ (2013) Murine Model of Neonatal Cytomegalovirus Infection. In: Cytomegaloviruses: From Molecular Pathogenesis to Intervention, vol. 2 (Lemmermann), M. J. R. w. t. a. o. N. A. W., ed), p 1046 Mainz: Caister Academic Press.

Yrjanheikki J, Tikka T, Keinanen R, Goldsteins G, Chan PH, Koistinaho J (1999) A tetracycline derivative, minocycline, reduces inflammation and protects against focal cerebral ischemia with a wide therapeutic window. P Natl Acad Sci USA 96:13496-13500.

SUPPLEMENTARY MATERIAL ONLINE

Doxycycline throughout pregnancy prevents against postnatal mortality, sensorimotor impairment and epileptic seizures caused by cytomegalovirus infection of the embryonic rat brain

Robin Cloarec[1,2,3]*, Sylvian Bauer [1,2,3]*, Natacha Teissier[4,5,6], Fabienne Schaller[1,2,3,7], Hervé Luche[8,9,10], Manal Salmi[1,2,3], Sandra Courtens[1,2,3], Emilie Bois[4,5,6], Emilie Pallesi-Pocachart[1,2,3,11], Emmanuelle Buhler[1,2,3,7], Pierre Grenot[8,9,10], Homa Adle-Biassette[4,5,6], Pierre Gressens[4,5,6], Marie Malissen[8,9,10], Thomas Stamminger[12], Daniel N. Streblow[13], Nadine Bruneau[1,2,3], Pierre Szepetowski[1,2,3]

*both authors contributed equally to this work

[1]INSERM U901, Marseille, France. [2]Mediterranean Institute of Neurobiology (INMED), Marseille, France. [3]UMR_S901, Aix-Marseille University, Marseille, France. [4]INSERM U1141, Paris, France. [5]Paris Diderot University, Sorbonne Paris Cité, Paris, France. [6]PremUP, Paris, France. [7]PPGI platform, INMED, Marseille, France. [8]CIPHE (Centre d'Immunophénomique), PHENOMIN, UM2 Aix-Marseille University, Marseille, France. [9]INSERM US012, Marseille, France. [10]CNRS UMS3367, Marseille, France. [11]PBMC platform, INMED, Marseille, France. [12]Institute for Clinical and Molecular Virology, University of Erlangen-Nuremberg, Erlangen, Germany. [13]Vaccine & Gene Therapy Institute, Oregon Health and Science University, Portland, OR, USA.

¶To whom correspondence should be addressed: Dr Szepetowski, Institut de Neurobiologie de la Méditerranée (INMED), Inserm U901, Parc Scientifique de Luminy, BP13 - 13273 Marseille Cedex 09, Tel.: +33 (0)4 91 82 81 11 - Fax : +33 (0)4 91 82 81 01 - e-mail: pierre.szepetowski@inserm.fr

Supplemental Figure 1. Effects of clodronate liposomes on rat cytomegalovirus (RCMV) infection, on brain phagocytes, and on survival and sensorimotor function.

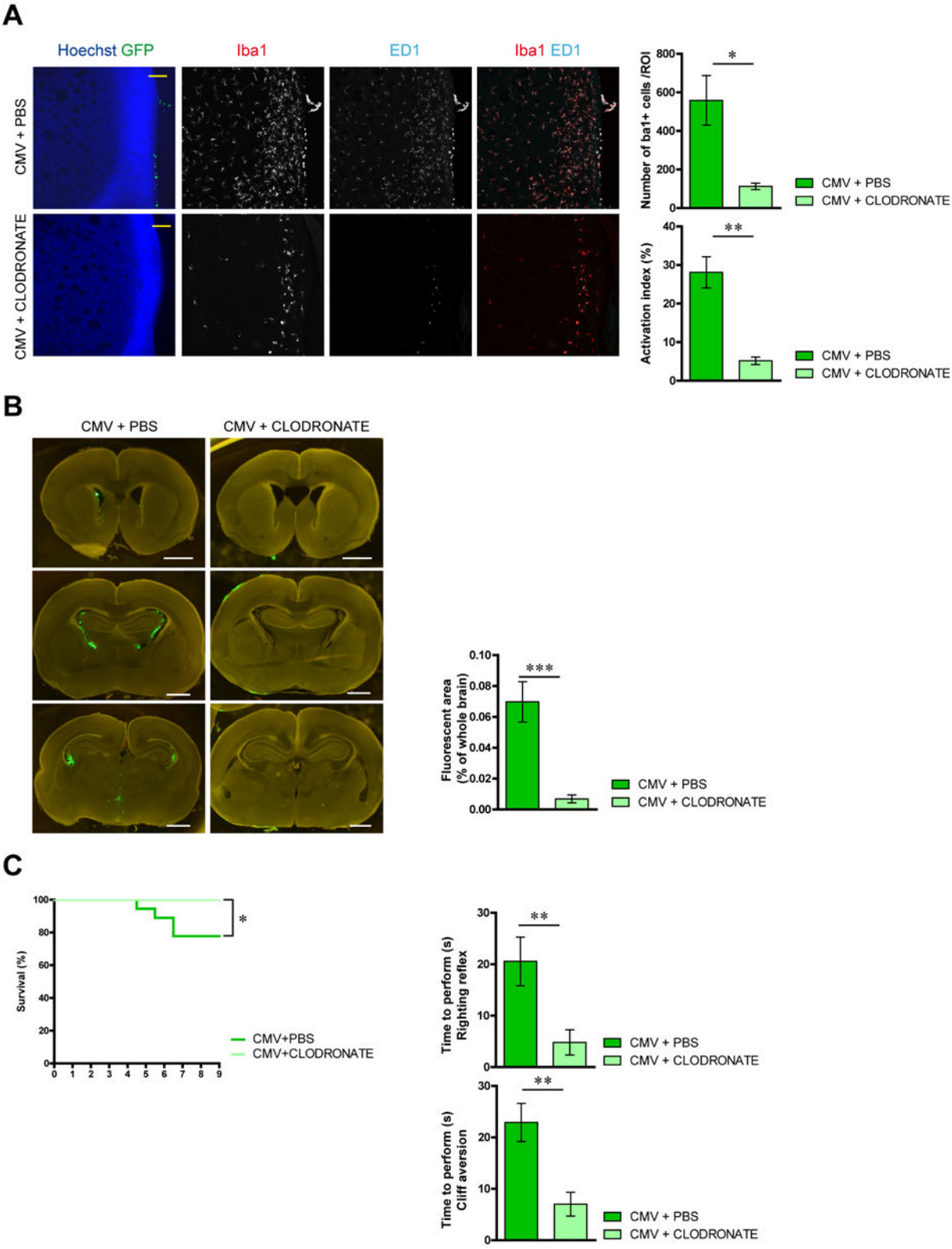
Recombinant RCMV allowing expression of GFP (green) in the infected cells, was injected intraventricularly (icv) in embryos from time-pregnant rats at embryonic day 15 (E15). Either of clodronate liposomes to deplete brain phagocytes, or liposomes with phosphate buffer saline (PBS) used as a control, were co-injected with RCMV icv.

(A) Clodronate liposomes icv decrease number of $Iba1^+$ microglia/macrophages (red) and of $Iba1^+$, $Ed1^+$ (cyan) activated microglia/macrophages. Immunohistological experiments were performed on coronal sections observed by confocal microscopy. Three to four adjacent brain sections were analyzed throughout the entire z-dimension for each sample. Activation index in a given region of interest (ROI) was calculated as the ratio of the number of $Iba1^+$, $Ed1^+$ activated cells versus total number of $Iba1^+$ cells. Six brains were analyzed in each condition. Mann-Whitney test, two-tailed, with Bonferroni correction. **: $p < 0.005$; *: $p < 0.025$. Bar: 100 μm.

(B) Clodronate liposomes icv limit RCMV infection. Brains were analyzed at postnatal day 1 (P1) using fluorescent binocular microscopy. Three sections were analyzed in the rostrocaudal axis for each sample. The number of infected areas and of infected cells decreased dramatically after treatment with clodronate liposomes (n = 7 brains in each condition), as also quantified by measuring the proportion of fluorescent areas over the whole brains and excluding meninges. Mann-Whitney test, two-tailed. ***: $p < 0.001$. Bar: 1 mm.

(C) Clodronate liposomes icv improve survival and sensorimotor function. (Left panel) Survival rates as estimated on a daily basis from birth to P9, showed significant improvement in CMV+CLODRONATE group (n = 21 at birth) as compared with CMV+PBS group (n = 18 at birth). Log rank test was used to compare the survival curves: *: $p < 0.05$. (Right panels) Times to perform the righting reflex (top) and the cliff aversion reflex (bottom) sensorimotor developmental tests improved significantly in CMV+CLODRONATE group (n = 16) *vs* CMV+PBS group (n = 9). Mann Whitney test, two-tailed: **: $p < 0.01$.

Supplemental Fig1



DISCUSSION

La mise au point et la caractérisation d'un nouveau modèle d'infection cérébrale congénitale par le CMV, dans le cas présent chez le rat in utero, nous a non seulement permis de confirmer et mieux, de préciser certains éléments déjà rapportés dans certains autres modèles, mais également de mettre en exergue le rôle important de certains mécanismes neuroimmunologiques se mettant en place précocement une fois le CMV présent dans le cerveau. En particulier l'intervention de la microglie et plus généralement des phagocytes cérébraux semble occuper une place de premier plan dans la progression du processus infectieux et dans l'émergence des manifestations cliniques postnatales. Contrairement au rôle de défense pour lequel ces cellules sont classiquement connues, notamment contre les virus, il s'avère qu'en présence du RCMV, leur participation contribuerait plutôt, en tout cas dans notre modèle, à favoriser la dissémination virale et les troubles neurologiques observés chez nos animaux.

Dans cette partie, nous discuterons de la pertinence de notre modèle vis-à-vis des infections congénitales à CMV chez le fœtus humain, à la fois sur le plan cellulaire et clinique. Nous discuterons aussi ce modèle relativement aux autres modèles animaux et plus particulièrement murins, en abordant notamment la problématique des voies d'inoculations du virus, des types cellulaires infectés, et des mécanismes physiopathologiques suspectés. Nous traiterons aussi plus spécifiquement des événements neuroimmunologiques mis en jeu dans notre modèle, et en particulier, du rôle possible des chimiokines, des cellules immunitaires périphériques, et, évidemment, de la microglie. Nous discuterons enfin plus précisément du rôle joué par les cellules phagocytaires cérébrales et l'activation microgliale, d'une part dans la dissémination cérébrale du RCMV, et d'autre part, dans l'émergence des phénotypes cliniques postnataux.

1. Un modèle particulier chez le rat est-il représentatif des infections congénitales humaines ? Convergences et divergences.

Comme nous l'avons déjà souligné précédemment, outre l'évidente différence entre les espèces concernées d'une part, et entre les souches virales d'autre part, le mode d'administration intracérébroventriculaire du RCMV utilisé dans notre modèle ne récapitule pas la voie de transmission verticale naturelle du virus ; elle ne prend pas en considération, notamment, les évènements relatifs à la barrière placentaire et le rôle probablement dual de celle-ci, ni l'infection préalable des organes périphériques du fœtus, ni encore le rôle de la barrière hémato-encéphalique.

Ces étapes, comme d'ailleurs l'immunité maternelle par exemple, sont autant de paramètres qui, chacun pris séparément, pourrait expliquer en grande partie la variabilité des conséquences d'une infection congénitale par le CMV. Du fait même ce cette complexité et de cette multiplicité, il semblait judicieux d'essayer d'appréhender chacun de ces évènements isolément, tout en gardant évidemment à l'esprit le caractère forcément incomplet de l'étude correspondante.

De surcroît, l'importance des étapes pré-cérébrales, aussi variables et multiples soient-elles, n'est que temporelle, et la genèse des pathologies cérébrales dépend ensuite très majoritairement des évènements qui suivent l'entrée du virus dans le cerveau, et des conséquences que la présence du virus entraîne. Quoi qu'il en soit notre approche "cérébro-centrique", si elle se trouve en quelque sorte validée par les résultats que nous avons obtenus, ne doit pas occulter son caractère volontairement partiel : nous progressons dans la compréhension d'une partie de la physiopathologie, pas de l'ensemble de celle-ci. Et encore le faisons-nous dans un modèle animal particulier, avec une souche virale donnée, un titre viral précis, selon un protocole expérimental et à un stade développemental spécifiques, en utilisant certaines méthodes d'analyses... Cela dit, s'il n'existe donc pas de modèle parfait ou complet de la pathologie humaine, il n'existe pas non plus un seul type d'infection congénitale par le CMV, mais une multitude de formes, aux conséquences parfois sévères voire dramatiques, parfois (apparemment) moins importantes, voire silencieuses.

De manière presque surprenante, si l'on considère tout ce qui précède, notre modèle, malgré les limites déjà évoquées plus haut, comporte finalement de nombreuses analogies avec la pathologie humaine, à la fois sur le plan de la localisation cérébrale du virus, du tropisme pour certains types cellulaires (microglie), et plus encore des conséquences sur le phénotype postnatal de nos animaux.

Plus précisément, la détection du RCMV dans des cellules des zones ventriculaires et subventriculaires, n’est pas sans rappeler la localisation periventriculaire constatée en neuro-imagerie, des calcifications post-nécrotiques associées à l’infection virale cérébrale humaine. D'autres similitudes existent, qu'il est inutile d'énumérer à nouveau ici. Tout juste peut-on souligner l'atteinte de l'oreille interne, compte tenu du déficit auditif observé dans notre modèle (mais l'atteinte auditive constatée a-t-elle réellement un lien mécanistique avec la pathologie humaine correspondante ?), ou encore l’infection des bulbes olfactifs, qui pose la question des conséquences à long terme de l’infection congénitale par le CMV sur la neurogenèse adulte et l’olfaction (McGrath et al. 1997), (Sellner et al. 2009).

D'autres régions atteintes fréquemment et précocement dans notre modèle, sont les régions thalamiques et hypothalamiques ; là aussi, les conséquences à long terme sont potentiellement importantes, compte tenu du rôle respectif de ces structures dans le fonctionnement cérébral : il serait intéressant d'évaluer, ou de ré-évaluer, la fréquence de leur atteinte possible en pathologie humaine.

J'insisterai aussi ici sur un point de convergence avec l'infection humaine (Teissier et al, 2014), crucial dans le contexte de l'étude de notre modèle : celui de l'infection des cellules microgliales et des macrophages - cellules regroupées ici fonctionnellement sous le terme de 'phagocytes cérébraux'. Si des études in vitro suggéraient l'absence d'un cycle viral productif du HCMV dans la microglie,(Lokensgard et al. 2002), les observations réalisées sur cerveau fœtal humain (Teissier et al. 2014) et dans notre modèle, révèlent l'infection effective de phagocytes cérébraux - soulignant peut-être simplement l'imperfection des études in vitro ? Les phagocytes cérébraux constituent même la principale cible du RCMV in vivo, en tout cas dans nos conditions expérimentales.

Comme nous l'avons vu, l'infection de ces cellules, mais aussi leur état d'activation, semblent jouer un rôle prépondérant dans la dissémination virale et dans les conséquences postnatales. De fait, le ciblage préférentiel de ces cellules dans notre modèle, s'il n'est sans doute pas la règle dans toutes les infections congénitales cérébrales par le CMV (mais y-a-t-il seulement une règle ?), a permis d'interroger plus spécifiquement le rôle de ces cellules dans la physiopathologie.

Notons ici que le tropisme du CMV pour les macrophages est un fait bien connu au niveau des organes périphériques. Les macrophages ont pour précurseurs les monocytes, qui sont des cellules circulantes et considérées comme non permissives à l'infection par le HCMV. Cependant, le virus demeure latent au sein de ces cellules myéloïdes qui servent alors de vecteur de dissémination vers les différents tissus de l'organisme (Stern & Slobedman 2008). De plus, le HCMV stimule la différentiation des monocytes en macrophages, processus permettant d'initier un cycle de réplication virale complet et la production de virions dans l'environnement cellulaire (Chan et al. 2012). Dans une étude récente, il a notamment été montré chez la souris que les monocytes patrouilleurs de phénotype CX3CR1high CCR2low Ly6C-, classiquement qualifiés d'anti-inflammatoires, représenteraient la cible cellulaire principale du virus.

Il s'avère par ailleurs que les macrophages de polarisation M2, qui résultent de la différentiation de ces monocytes seraient beaucoup plus susceptibles à l'infection par le HCMV que les macrophages de phénotype M1, issus des monocytes pro-inflammatoires.(Bayer et al. 2013). Au sein d'un tissu, l'équilibre entre les formes M1 et M2 est crucial pour éviter les effets délétères de la réaction inflammatoire. De surcroît, l'infection par le HCMV semble orienter la polarisation des macrophages vers le phénotype M1 (Chan et al. 2008)qui a notamment pour conséquence d'induire une réponse proinflammatoires lymphocytaire de type Th1.

Contrairement aussi à ce qui a été récemment montré chez les fœtus humains (Teissier et al. 2014), et à ce qui est classiquement rapporté dans divers modèles murins,(Mutnal, Cheeran, et al. 2011b) (Sakao-Suzuki et al. 2014), nous n'avons en revanche pas retrouvé de progéniteurs neuraux infectés par le RCMV dans notre modèle. Ces anomalies ont pu être associées à la présence d'altérations de la migration neuronale et de la lamination corticale (Shinmura & Kosugi 1997), (Koontz et al. 2008). Si l'explication de cette divergence peut être multiple (différence d'espèce, ou de souche virale, entre autres), il n'en reste pas moins vrai que, à l'instar de la pathologie humaine et de différents modèles (quoique ces derniers semblent parfois incomplets, ou et parce qu'anciens), notre modèle présente des altérations, certes très localisées, mais bien visibles, de la structure de la glie radiaire. Compte tenu du rôle crucial de celle-ci dans la migration guidée des neurones de projection dans le futur néocortex cérébral, qui se déroule d'E12 à E18 chez le rat, des anomalies en regard de la lamination corticale sont très probables, et seraient évidemment à mettre en regard des anomalies structurelles cérébrales (Polymicrogyrie) causées par certaines infections congénitales par le CMV humain.

L'existence d'une interaction entre cellules souches neurales et microgliales/macrophages est d'ailleurs un phénomène connu (Su et al. 2014). En particulier au cours du développement cérébral, la microglie et les macrophages peuvent influencer la prolifération, la différentiation et la survie des progéniteurs neuraux. Cunningham et al (2013) ont de plus montré dans le cerveau de rat en développement, que les cellules Iba1+ présentes au niveau des zones prolifératives de la matrice germinale avaient une morphologie ameboïde traduisant un état d'activation de ces cellules.

D'autres points de convergence (absence ou rareté de la détection du virus dans les neurones matures) ou de divergence (astrocytes matures) existent, qui peuvent avoir des raisons conceptuelles (espèces, virus, stades développementaux et de maturation cellulaire) ou techniques différentes - sans oublier une probable dysexpression, causée par le CMV lui-même (Lecointe et al. 2002), (Baca Jones et al. 2009), (Miller et al. 2001), de marqueurs classiquement ciblés dans nos études pour catégoriser les sous-types cellulaires, rendant les interprétations définitives plus délicates.

La pertinence de notre modèle vis-à-vis de la pathologie humaine, s'observe également et peut-être surtout au niveau de ses conséquences cliniques telles qu'observées chez nos animaux au cours de la période post-natale. Ainsi, les animaux infectés in utero présentent-ils une surmortalité ; lorsqu'elles conduisent à l'émergence de pathologies néonatales sévères, les infections congénitales par le CMV peuvent aussi chez l'homme être une cause de mortalité, évaluée, dans le groupe des enfants symptomatiques à la naissance, entre 5 et 30% (Jones & Isaacs 1995), (Dollard et al. 2007), (Boppana et al. 2013) au cours des deux premières années de la vie.

Dans notre modèle, les rats infectés in utero développent aussi et progressivement des troubles sensorimoteurs, caractérisés par la présence fréquente d'une paralysie des pattes postérieures et un échec à deux tests d'évaluation sensorimotrice, toutes anomalies compatibles avec la paralysie cérébrale (PC) observée au décours de certaines infections congénitales chez l'homme. Les étiologies et facteurs favorisants de la PC sont multiples, et sa physiopathologie, qui reste mal comprise, implique certainement une grande variété de mécanismes, en particulier neuroinflammatoires. Sans aller jusqu'à affirmer un 'diagnostic' de paralysie cérébrale dans notre modèle, pathologie qui répond du reste à une définition assez large et à un cortège de symptômes variés, les déficits constatés dans notre modèle ont le mérite d'exister et permettent en tout cas de l'évoquer.

Toujours sur le plan des manifestations cliniques, nous avons pu observer la présence de crises d'épilepsies tonico-cloniques généralisées spontanées au cours des trois premières semaines de vie postnatale, chez les animaux infectés in utero par le RCMV - alors qu'aucune crise n'a été observée chez les animaux contrôles. Dans les cas des infections congénitales humaines, des crises d'épilepsie sont retrouvées entre 10 et 30% des cas d'infections symptomatiques, et dans 0.9% des cas d'infection asymptomatiques.(Dreher et al. 2014).

Une étude rétrospective fait état d'une incidence de crises de 37% pour des enfants d'un âge moyen de 20 mois (Suzuki et al. 2008).
Il faut noter que dans notre étude, l'occurrence des crises spontanées a été évaluée au cours de périodes développementales précoces qui n'ont pas fait l'objet d'études systématiques chez l'homme dans le contexte des infections congénitales par le CMV.

Une autre caractéristique de notre modèle est la présence de troubles de l'audition chez nos animaux infectés in utero par le RCMV. Chez l'humain, la surdité représente une composante majeure des séquelles neurosensorielles de l'infection, survenant à plus ou moins long terme au cours de l'enfance. Des potentiels évoqués auditifs (PEA) ont été enregistrés à P40 et ont révélé un déficit chez les animaux infectés par le RCMV, comparé aux animaux contrôles. Si les PEA ne permettent pas de distinguer l'origine cérébrale ou vestibulo-cochléaire de la perte sensorielle, leurs anomalies traduisent en tout cas une altération de la transmission nerveuse entre l'oreille moyenne-interne et le tronc cérébral. Dans les modèles murins d'infection congénitale par le MCMV, il a néanmoins été mis en évidence la présence d'une progressivité du déficit auditif entre le 3ème et le 12ème mois postnatal qui semble également dépendre de la charge virale inoculée (Bradford et al. 2015). Il faut toutefois rester prudent sur l'analogie entre le déficit constaté chez le rat, et la surdité observée chez l'homme. Le caractère progressif par exemple n'a pu ici être évalué, compte tenu de l'apparition chez nos rats-contrôles, de déficits entre P40 et P60. Il s'agit peut-être là des prémisses de la surdité constatée chez les rats Wistar âgés (Alvarado et al. 2014). Par ailleurs, les types cellulaires affectés, et les structures en cause (cochlée, tronc cérébral...) ne sont pas forcément comparables.

Une fois tous ces éléments discutés et tempérés, il faut constater que la coexistence d'une mortalité postnatale précoce, de troubles sensorimoteurs, de crises d'épilepsie spontanées, et d'un certain degré de déficit auditif, permet de conclure que notre modèle récapitule de manière assez fidèle un certain nombre d'anomalies cliniques cardinales retrouvées classiquement dans la pathologie humaine correspondante.

La comparaison entre notre modèle et la pathologie humaine, pourrait utilement se doubler d'une comparaison avec les autres modèles, notamment murins. Ce point a déjà été abordé en partie dans le chapitre introductif, et il n'est pas forcément nécessaire d'énumérer à nouveau les nombreuses divergences méthodologiques. Les modèles animaux d'infection congénitale par le CMV sont en effet variés et ont permis de proposer un certain nombre d'hypothèses concernant les mécanismes physiopathologiques mis en jeu.

Plus spécifiquement, les modèles murins ont fait l'objet d'étude diverses, autant sur le plan méthodologique que sur le plan des résultats obtenus. Ainsi, plusieurs études ont opté pour une inoculation transplacentaire ou intrapéritonéale, d'autres pour une injection intracérébroventriculaire embryonnaire. Certaines de ces études sont parfois anciennes et peu prennent en considération les événements précoces in utero. Malgré ces nombreuses différences, des convergences peuvent être dégagées, témoignant d'une certaine robustesse de ces modèles, d'une certaine universalité des mécanismes considérés, ou encore de la focalisation des équipes concernées sur un même type de concepts et de mécanismes.

Au regard des modèles murins d'infection congénitale par le CMV, notre modèle décrit un patron de dissémination temporo-spatial du virus dès les stades embryonnaires précoces de l'infection ; à l'instar d'une étude récente sur le MCMV parue durant le travail présenté ici (Sakao-Suzuki et al. 2014), nous mettons en évidence un tropisme précoce du CMV pour la microglie et les macrophages ainsi que la localisation périventriculaire, dans les plexus choroïdes et les méninges. Par conséquent, dans nos conditions expérimentales, l'inoculation du RCMV par voie intracérébroventriculaire, bien que réductrice vis-à-vis de la voie de transmission naturelle du virus, conduit à des résultats similaires à un modèle murin d'inoculation transplacentaire.

L'atteinte précoce des plexus choroïdes dans notre modèle, pourrait amener à discuter de leur rôle dans la pathologie humaine. En effet certains travaux suggèrent que ces structures, qui sont à l'interface entre la circulation systémique, le LCR qu'elles secrètent et le parenchyme cérébral, interviennent dans les pathologies infectieuses du SNC. De nombreux organismes pathogènes comme les bactéries, les parasites, les champignons et les virus peuvent traverser la barrière sang-LCR constituée par les cellules épithéliales et endothéliales des plexus choroïdes, pour pénétrer dans le SNC et causer des maladies neuroinflammatoires telles que les méningites et les méningoencéphalites.(Schwerk et al. 2015). Les altérations structurales des plexus choroïdes potentiellement occasionnées par ces pathogènes, peut notamment perturber les fonctions de synthèse, de sécrétion et de transport du LCR, et être à l'origine de troubles neurologiques.(Marques & Sousa 2015). De plus, en réponse à l'infection, les plexus choroïdes choroïde libèrent des cytokines et des chimiokines aux propriétés chimio-attractives et responsables du recrutement de cellules périphériques dans le SNC.

Ces cellules peuvent, d'une part, servir d'hôte aux virus et favoriser leur dissémination, comme c'est notamment le cas dans le modèle murin d'infection par le virus Coxsackie B3.(Tabor-godwin et al. 2010) et d'autre part, participer aux phénomènes neuroinflammatoires, pouvant expliquer, au moins en partie, l'émergence de pathologies cérébrales diverses. (Schwerk et al. 2015). Ces données, combinées aux résultats obtenus dans notre modèle suggèrent que le rôle joué par les plexus choroïdes dans la physiopathologie de l'infection cérébrale par le CMV est probablement sous-évaluée et mériterait d'être exploré plus en profondeur.

Au cours des dernières années, des travaux convergents sur des modèles murins ont fait état de l'implication possible de processus neuroimmunologiques au cours des infections congénitales par le CMV ((Kosmac et al. 2013), (Slavuljica et al. 2014), (Sakao-Suzuki et al. 2014). L'infection par elle-même n'explique pas forcément l'ensemble des malformations cérébrales et des pathologies neurosensorielles.

Ainsi, la plupart des modèles murins mettent en évidence un contraste marqué entre la distribution très focale du foyer infectieux cérébral, la faible quantité de cellules infectées et la présence d'anomalies morphologiques diffuses (Koontz et al. 2008), (Kosmac et al. 2013). Ces données suggèrent l'intervention probable de mécanismes indirects induits par le virus, par exemple médiés par une réponse inflammatoire à l'infection. Même si notre modèle n'en tient pas compte, l'activation immunitaire maternelle (AIM) initiale induite par la présence du virus dans le sang de la mère, pourrait aussi participer aux altérations cérébrales observées dans la pathologie humaine. Des études épidémiologiques ont pu montrer une forte association entre l'infection virale maternelle et un risque augmenté pour la descendance de développer des troubles neurologiques et/ou psychiatriques.(Labouesse et al. 2015).

D'abondantes preuves suggèrent de plus un lien similaire entre l'activation immunitaire maternelle (AIM) et le développement de pathologies comme la paralysie cérébrale (Knuesel et al. 2014). Le phénomène d'AIM a été très peu étudié dans le cadre du CMV. En effet, étant donné le fort tropisme de ce virus pour les cellules cérébrales, la majorité des travaux, et les nôtres y compris, se sont principalement focalisées sur les effets du virus sur le SNC. Bien que l'AIM soit souvent associée à des conséquences délétères pour le SNC, en particulier en raison des médiateurs pro-inflammatoires libérés, une étude récente réalisée chez le singe Rhésus a mis en évidence un rôle bénéfique des lymphocytes T CD4+ présents dans le sang maternel, en réponse à l'infection par le rhCMV (Bialas et al. 2015).

2. Un rôle crucial et paradoxal pour la microglie et son activation dans notre modèle ?

Comme cela a été montré plus haut et comme cela sera discuté plus bas, l'activation microgliale constatée dans notre modèle à la fois au niveau des zones d'infection active, et à l'échelle globale du cerveau infecté, pourrait donc avoir un effet néfaste, d'une part en favorisant la dissémination virale, et d'autre part, en créant un environnement pro-inflammatoire délétère pour le tissu cérébral, participant à l'émergence des troubles neurologiques observés chez les animaux infectés. L'effet notamment de la doxycycline sur l'état d'activation de la microglie d'une part, et sur les troubles neurologiques d'autre part, va dans ce sens.

La doxycycline est un antibiotique de la famille des tétracyclines, connue pour exercer différentes activités biologiques incluant des propriétés anti-inflammatoires, anti-apoptotiques, inhibiteur de la protéolyse et anti-angiogéniques. La minocycline et la doxycycline sont les tétracyclines les plus couramment utilisées pour inhiber l'activation microgliale et diffèrent notamment par leurs capacités respectives à traverser la BHE. La minocycline serait deux fois plus liposoluble que la doxycycline et pénètre plus facilement dans le LCR, ce qui rend cette molécule particulièrement utile pour agir au niveau du SNC (Cunha 2000). Néanmoins, la minocycline aurait des effets paradoxaux sur l'activation microgliale en fonction du stade développemental (Arnoux et al. 2014), ce qui n'a en tout cas pas encore été rapporté pour la doxycycline. De plus, la doxycycline aurait moins d'effets indésirables que la minocycline et peut être administrée au nouveau-né. Ces données ont donc orienté notre choix vers la doxycycline qui est également liposoluble et accède facilement au SNC (Cunha 2000). De plus et surtout, il a déjà été montré que l'administration de doxycycline entre E15 et P10 chez la rate gestante est bien associée à une réduction de l'activation microgliale chez la progéniture (Cunningham 2013).

Bien que les mécanismes d'action des tétracyclines soient pluriels, certains d'entre eux jouent un rôle probable dans l'inhibition de l'activation microgliale. La minocycline inhiberait ainsi notamment l'induction de l'enzyme de conversion de l'IL-1 beta ainsi que l'expression de l'enzyme iNOS, qui sont toutes deux caractéristiques de la microglie activée.

L'inhibition de la caspase 3 activée par la doxycycline constitue également un mécanisme possible (Jantzie et al. 2005). En effet, des travaux suggèrent que la signalisation des caspases, notamment des caspases-8 et 3/7 contrôle l'activation microgliale et leur inhibition favorise le phénotype quiescent de ces cellules.(Burguillos et al. 2011).

Plusieurs mécanismes permettent d'expliquer l'efficacité de la doxycycline sur réduction du nombre de cellules infectées par le RCMV.

L'inhibition de l'activation microgliale pourrait indirectement avoir un effet sur la dissémination virale, par le biais de la réduction du processus de phagocytose. (Cunningham 2013). En effet, comme nous l'avons précédemment abordé dans le cadre des études pilotes réalisées avec les liposomes clodronate, ce processus cellulaire pourrait être à la base de la propagation du RCMV de cellules en cellules. De manière intéressante, la doxycycline inhibe la polarisation M2 des macrophages (Lizhi He and Alexander G. Marneros), phénotype qui est principalement ciblé par le HCMV (Bayer et al. 2013) et le MCMV (Daley-Bauer et al. 2014).

L'inhibition de l'activation microgliale n'est cependant pas le mécanisme exclusif permettant d'expliquer l'efficacité de la doxycycline sur l'infection virale dans notre modèle et plusieurs autres modes d'action complémentaires sont envisageables. Ainsi, cette molécule pourrait exercer un effet inhibiteur direct sur la réplication virale, comme cela a été montré pour la minocycline vis-à-vis d'autres virus (Mishra & Basu 2008). Alternativement, le HCMV, comme nous l'avons déjà abordé, est connu pour réguler temporellement l'expression de la caspase 3 afin de stimuler la différentiation des monocytes en macrophages, (Chan et al. 2012) et l'inhibition de cette protéine empêche ce processus. La différentiation des monocytes en macrophages intervenant sans doute dans la dissémination du RCMV, la doxycycline pourrait donc indirectement, par l'intermédiaire de l'inhibition de la caspase-3, prévenir la propagation du RCMV au sein du cerveau embryonnaire.

Si un mode d'action plus multiple et complexe des tétracyclines n'est pas à exclure, les résultats obtenus avec les liposomes clodronate, dont le mode d'action sur la microglie et les macrophages est clairement différent, vont également dans le même sens - même si leur impact postnatal a été évalué de manière moins complète.

Il faut néanmoins ici ne pas oublier que d'autres acteurs de la réponse immunitaire, d'ailleurs perturbés dans notre modèle et dans d'autres, pourraient bien aussi jouer un rôle important au niveau physiopathologique. Il est donc intéressant de discuter ici du recrutement des cellules périphériques, des chimiokines et cytokines, et, donc, du contexte dans lequel survient l'activation microgliale.

Certaines cytokines sont majoritairement anti-inflammatoires comme l'IL-10, l'IL-22, TGF-beta, d'autres pro-inflammatoires, comme CCL2, IL1-beta, IL6, TNF-alpha. Elles peuvent être libérées par les cellules infectées comme par les cellules environnantes.

Une infection virale induit généralement une réponse inflammatoire, caractérisée par une augmentation de l'expression de cytokines pro-inflammatoires : TNF-alpha, IL1-beta et IL-6. Cependant, dans notre modèle, ce "trio" inflammatoire n'est pas significativement augmenté. De plus, dans le cas du TNF-alpha, une diminution d'expression est même observée à E16, soit 24h après l'injection ICV du RCMV. De manière intéressante, des travaux ont suggérés que le HCMV pouvait atténuer l'expression de TNF-alpha et d'IL-1 beta. Ce phénomène serait à la base du mécanisme d'évasion virale, permettant notamment au CMV de rester latent au sein de la cellule hôte sans susciter de réaction immunitaire. (Jarvis et al. 2006). Ces données suggèrent que la réaction inflammatoire survenant dans notre modèle, pourrait être en quelque sorte masquée par ce phénomène.

Nous avons par ailleurs mis en évidence que l'expression de gènes codant pour certaines chimiokines cellulaires, notamment impliquées dans le recrutement de cellules immunitaires périphériques, était perturbée. Dès le stade E16 puis à E17 et P1, l'expression du gène codant pour la chimiokine CCL12 est significativement augmentée. Cette chimiokine est un homologue structural et fonctionnel de CCL2, connu pour avoir un effet chimiotactique notamment sur les polynucléaires, les monocytes et les lymphocytes. Les chimiokines CCL2, CCL12 et CCL7 ont pour récepteur CCR2, présent à la surface des monocytes Ly6C+ proinflammatoires, et interviennent dans la migration de ces cellules dans le SNC. De manière intéressante, CCL12 serait exprimée au niveau des plexus choroïdes et participerait, comme nous l'avons déjà évoqué, à la dissémination du virus Coxsackie B3 via le recrutement de cellules myéloïdes au niveau des cellules épithéliales de cette structure. (Tabor-godwin et al. 2010). Dans notre modèle, les plexus choroïdes étant une structure préférentiellement ciblée par le RCMV, et au vu du tropisme viral pour les cellules myéloïdes, il est possible que des mêmes mécanismes soient partagés avec l'infection cérébrale par le virus Coxsackie B3. Dans une expérience-pilote, l'utilisation d'un anticorps neutralisant dirigé contre la protéine murine correspondante, et co-injecté avec le virus au moment de son inoculation icv à E15 pour tenter d'inhiber (plus ou moins) spécifiquement la chimiokine CCL12, n'a pas donné de résultats positifs en termes de dissémination virale à P1, et son effet sur le phénotype postnatal des animaux n'a pas été évalué. L'échec apparent de cette tentative imparfaite ne permet pas de conclure sur le rôle de CCL12 dans notre modèle.

Nous avons également montré l'induction précoce de l'expression du gène codant pour la chimiokine virale r129, homologue de la protéine UL128 du HCMV (Vomaske et al. 2012) et de la protéine MCk2 du MCMV (Noda et al. 2006). De nombreuses études ont mis en évidence le rôle de chimiokines d'origine virale, dans la mobilisation et le recrutement de leucocytes. Dans le cas du RCMV, la protéine r129 (Vomaske et al. 2012) semble avoir une action chimiotactique sur les lymphocytes et les monocytes/macrophages.

Chez la souris, le blocage de la chimiokine MCK-2 (Daley-Bauer et al. 2014) inhibe le recrutement de monocytes patrouilleurs CCR2- Ly6Clow CX3CR1high au niveau du site infectieux, et empêche effectivement la dissémination du MCMV.
Le ciblage de la protéine r129 permettrait-il aussi de limiter l'infection par le RCMV dans notre modèle, et aurait-il un effet sur les manifestations neurologiques observées ?
Aussi et en se basant sur l'étude de Daley-Bauer et al (Daley-Bauer et al. 2014), le RCMV pourrait initialement induire le recrutemement de monocytes patrouilleurs CX3CR1high au niveau des plexus choroïdes, notamment par le bais de la chimiokine r129, les infecter et stimuler leur différentiation en macrophages activés M2 pour induire la production de virions.

Par ailleurs, comme nous l'avons déjà mentionné les plexus choroïdes constituent une véritable porte d'entrée pour les macrophages M2 (Shechter et al. 2013), ce qui pourrait expliquer la localisation préferentielle du RCMV au niveau de cette structure cérébrale à E17. Si l'on replace cette hypothèse dans le contexte de la pathologie humaine, l'on peut aisément imaginer que l'infection systémique initiale de ces monocytes patrouilleurs, à la manière d'un Cheval de Troie, puisse constituer une stratégie de dissémination du CMV in utero.

D'une manière générale d'autres cytokines et chimiokines et d'autres protéines sont susceptibles de voir leur expression perturbée dans le contexte d'une infection par le CMV, que ce soit localement ou plus généralement. Une étude plus globale que notre approche ciblée par RT-PCR quantitative, en utilisant des puces ARN, aurait certainement permis la mise en évidence de multiples dysrégulations. Néanmoins l'interprétation de celles-ci et la multiplicité de leurs interactions possibles, n'aurait sans doute pas apporté beaucoup plus d'enseignements directs, relativement aux questions posées ; et il reste vrai que souvent, les études globales, pan-génomes, aboutissent au ciblage précis par qRT-PCR, des gènes semblant les plus pertinents - ceux-là même qui sont sélectionnés dans des approches-candidats.

Un lien mécanistique possible entre l'infiltrat monocytaire observé dès le stade E17 d'une part, et l'activation microgliale constatée à P1 d'autre part, pourrait être discuté.
En effet sous certaines conditions, les monocytes CCR2+ Ly6C+ recrutés dans le SNC de la souris adulte peuvent contribuer au pool microglial existant. En d'autres termes ces cellules joueraient le rôle de précurseurs microgliaux permettant, en condition inflammatoire, de supplémenter le système immunitaire cérébral, par un apport exogène de macrophages. Ce phénomène a notamment été mis en évidence au cours des infections cérébrales par le virus du Nil occidental (Getts et al. 2008).

Cependant, le phénotype de ces macrophages recrutés n'est pas clair, et constitue une source de nombreux débats. Sur leur plan de leur morphologie et de l'expression de certaines protéines cellulaires, ils sont difficilement distinguables de la microglie activée.
En effet, à l'instar de ces dernières, ces macrophages expriment également Iba-1, ainsi que les marqueurs d'activation CD68, iNOS et le CMH de classe II. Les taux de CD45 évalué par cytométrie de flux peuvent permettre de distinguer la microglie activée, qui exprime des taux intermédiaires (CD45int), des macrophages issus de monocytes périphériques, qui eux expriment fortement CD45 (CD45high). Dans notre modèle, l'activation microgliale observée à P1, en condition d'infection par le RCMV pourrait au moins partiellement résulter d'un recrutement précoce de monocytes. Les monocytes CCR2+ se différentient potentiellement en cellules dendritiques ; cette population augmente effectivement à E17. A P1, la réduction du pool monocytaire constaté, la stagnation de la population de DC et en parallèle l'augmentation de la proportion de microglie activée, suggèrent une contribution effective de la différentiation monocytaire en microglie/macrophages au sein du SNC infecté par le RCMV.

Outre la microglie résidente activée (voir plus loin), les monocytes pourraient donc représenter un des mécanismes neuroimmunologiques importants mis en jeu dans notre modèle, et une véritable piste concernant la physiopathologie des infections par le CMV du cerveau fœtal humain. En effet, les monocytes permettraient d'une part, l'initiation de la dissémination du RCMV selon un mode « Cheval de Troie » (phénomène que nous n'avons pas abordé dans le cadre de notre modèle), et d'autre part, en raison de leur différentiation en microglie activée, contribuer aux processus immunopathologiques responsables de dommages cérébraux et de l'émergence de troubles neurologiques. Par ailleurs, étant donné ce rôle possible des leucocytes circulants comme vecteurs de transport du virus dans la circulation systémique, nous avions décidé d'évaluer dans notre modèle, l'effet d'une déplétion périphérique des cellules phagocytaires en utilisant les liposomes clodronate. Cette étude a révélé que l'administration de ces liposomes à la périphérie des embryons infectés à E15 induisait une réduction significative du nombre de cellules infectées par le RCMV dans le parenchyme cérébral des cerveaux analysés à P1.

Ce résultat suggère, bien que notre modèle ne tienne pas compte de la dissémination périphérique initiale du virus, que les cellules phagocytaires jouent probablement un rôle clé dans la stratégie de dissémination du RCMV dans le cerveau embryonnaire.

3. Lien entre l'activation microgliale associée à l'infection et les pathologies neurologiques constatées

Dans notre modèle, l'administration de doxycycline au cours de la gestation est associée à une amélioration des paramètres cliniques évalués au cours du développement postnatal de nos animaux.

Le rôle de l'inhibition de l'activation microgliale dans le sauvetage de ces phénotypes est évidemment le mécanisme privilégié dans notre modèle, d'une part sur le plan de la réduction du nombre de cellules infectées permettant de limiter les altérations tissulaires inhérentes à l'infection, et d'autre part en évitant les dommages collatéraux causés par les processus neuroinflammatoires.

Comme nous l'avons évoqué à plusieurs reprises, un nombre croissant d'études récentes montre une association entre l'altération de la microglie et l'émergence de troubles neurologiques. (Prinz & Priller 2014),(Perry & Teeling 2013) (Perry & Holmes 2014).

Dans notre modèle, plusieurs mécanismes peuvent être envisagés pour relier l'altération de la réponse microgliale et les pathologies constatées.

Par exemple, l'augmentation de l'activation microgliale induite par le RCMV au cours du développement cérébral pourrait par avoir un impact sur la neurogenèse ; d'une part en raison d'une phagocytose excessive des progéniteurs neuraux, (Cunningham 2013) et d'autre part du fait de la libération, par cette microglie activée, de cytokines proinflammatoires qui peuvent potentiellement avoir un effet délétère sur la prolifération ou l'autorenouvèlement des cellules souches neurales.(De Miranda et al. 2010).(Kizil et al. 2015) . L'altération focale (dans les régions infectées) de la glie radiaire dans notre modèle pourrait également résulter de phénomènes neuroinflammatoires bien localisés, potentiellement médié par les cellules infectées.

Il également été montré que le fait de perturber la microglie au cours développement cérébral chez la souris pouvait notamment avoir une incidence sur la sur le positionnement des interneurones corticaux.(Squarzoni et al. 2014).

Même si aucuns défauts évidents de l'organisation corticale n'ont pu être mis en évidence dans notre modèle il est cependant probable, compte tenu du phénotype clinique de nos animaux, que le fonctionnement des réseaux neuronaux soit altérés par les mécanismes neuroinflammatoires précédemment proposés.

De manière intéressante, la microglie serait de plus impliquée dans l'élagage synaptique, processus indispensable au développement cérébral normal, (Paolicelli et al. 2011) et dont l'altération pourrait également sous-tendre les phénotypes cliniques constatés.

Dans le cadre des troubles sensorimoteurs observés chez nos animaux, l'activation microgliale a été proposée comme mécanisme potentiellement responsable de l'apparition de troubles sensorimoteurs. En particulier, au cours de la paralysie cérébrale, les constituants du SNC sur lesquels cette activation microgliale a un impact ne sont pas connus. De surcroît un certain nombre d'études établit un lien entre l'activation microgliale et l'altération de la substance blanche (SB) phénomène qui pourrait potentiellement sous-tendre les troubles sensorimoteurs observés chez nos animaux. De plus, la présence RCMV, et donc de microglie activée dans la zone ventriculaire ventrale, en regard du striatum ainsi qu'au niveau du tronc cérébral et du cervelet, étant donné l'implication de ces structures dans le contrôle de la locomotion, pourrait également expliquer la présence ces déficits.

La surdité représente une cause majeure d'atteinte sensorielle liée aux infections congénitales par le CMV. Dans notre modèle, les animaux infectés par le RCMV présentent un déficit auditif qui n'est pas corrigé par l'administration de la doxycycline. Plusieurs hypothèses peuvent expliquer l'absence de sauvetage de l'audition par cette molécule. Tout d'abord, un certain nombre d'études suggère que les tétracyclines peuvent avoir un effet ototoxique chez l'adulte, causée par une dégénérescence des cellules sensorielles de la cochlée. Au cours du développement les conséquences des tétracyclines sur l'audition ne sont pas connues, étant donné le risque potentiel que ces dernières peuvent occasionner. Par conséquent, dans notre modèle, un phénomène otoxique , voire tératogène sur le développement de l'oreille interne causé par le traitement à la doxycycline pourrait potentiellement devenir prépondérant et masquer le sauvetage médié par cette molécule, chez nos animaux infectés par le RCMV. Néanmoins, Corbacella et al ont mis en évidence in vitro, un effet bénéfique de la minocycline dans un modèle d'altération des cellules sensorielles de cochlée néonatales par la gentamicine. De plus, ils montrent également que l'application de doxycycline seule n'a pas d'effet sur la survie des cellules ciliées. (Corbacella et al. 2004). De surcroît, une étude récente a démontré in vivo chez la souris, un rôle délétère de l'activation des cellules microgliales-like (MCL) de l'oreille interne sur la survie des cellules ciliées, notamment par la mise en jeu de l'axe Fractalkine-CX3CR1. En outre, l'administration de minocycline chez ces animaux, réduit l'activation des MLC et corrige les déficits auditifs induits par la néomycine. (Sun et al. 2014)

L'absence de correction du déficit auditif présent chez nos animaux infectés par le RCMV, pourrait également être due à l'effet délétère de l'inactivation des cellules microgliales-like de l'oreille interne au cours du développement in utero. En effet contrairement à ce qui est observé pour le cerveau, cette activation pourrait d'une part être nécessaire au développement embryonnaire normal de la cochlée et donc son inhibition entrainerait des conséquences à long terme néfastes sur l'audition. D'autre part, si l'on considère que les macrophages ne sont pas la cible principale du RCMV au niveau de l'oreille interne, l'inhibition de leur activation pourrait empêcher la clairance de l'infection virale au niveau de cette structure et induire des altérations irréversibles du développement du système auditif.

L'émergence de crises spontanées tonic-cloniques dans le groupe des animaux infectés par le RCMV peut également être attribuée à l'activation microgliale. En effet, des travaux récents suggèrent la mise en jeu de l'axe Fractalkine - CX3CR1 dans l'induction des crises (Ali et al. 2015). De surcroît, la mort neuronale engendrée par les crises va maintenir cet état d'activation aberrant ce qui constitue un véritable cercle vicieux. Ce phénomène est d'ailleurs renforcé par l'augmentation de la signalisation purinergique microgliale entrainant un état particulier d'activation et survenant après l'induction du status epilepticus (Avignone et al. 2008). Dans notre modèle l'administration de doxycycline est associée à une réduction de l'incidence des crises tonico-cloniques spontanées évaluées au cours des trois premières semaines postnatales. Bien que cet effet ne puisse pas être directement attribué à une action direct de la doxycycline sur l'émergence des crises, Wang et al ont pu mettre en évidence une action protectrice des tétracyclines, et notamment de la minocycline, contre l'apparition de crises partielles in vivo et suggérant un effet anticonvulsivant de ces molécules (Wang et al. 2012). De surcroit, nos résultats révèlent un lien probable entre la survenue de convulsions chez nos animaux et la mortalité postnatale. En effet, les crises d'épilepsies peuvent dans certains cas être létales, comme le témoignent les études sur les SUDEP (Sudden Death in Epilepsy) (Lhatoo et al. 2015). Par ailleurs, l'atteinte des organes périphériques chez nos animaux constitue une cause probable de mortalité. En particulier, une hépatite fulminante causée par l'infection, au-delà du risque pour le pronostic vital que celle-ci entraine, peut être à l'origine d'encéphalopathies épileptiques (Lewis & Howdle 2003).

En dépit de l'efficacité de la doxycycline pour réduire l'incidence de phénotypes pathologiques dans notre modèle, il est important de garder à l'esprit qu'il s'agit ici seulement d'une preuve de concept, permettant de proposer l'activation microgliale comme mécanisme possible.

De surcroît, compte tenu des limites d'utilisation de cette molécule pendant la grossesse et chez le nouveau-né, il est bien sûr difficilement envisageable ici de présenter la doxycycline en tant que moyen thérapeutique. Des molécules capables d'inhiber l'activation microgliale et exemptes d'effets néfastes pendant la gestation pourrait notamment constituer une alternative à l'utilisation de la doxycycline.

Nous disposons d'un nouveau modèle animal d'infection congénitale par le CMV, qui récapitule, sur le plan cellulaire et clinique un certain nombre de caractéristiques de la pathologie humaine. Au regard des différents modèles murins développés, notre modèle démontre une fois de plus l'importance des processus neuroimmunologiques dans la physiopathologie de ces infections au cours du développement cérébral in utero. En particulier, nos travaux mettent en exergue le rôle délétère de l'activation microgliale dans l'émergence de troubles neurologiques tels que l'épilepsie et la paralysie cérébrale et place la microglie au centre des stratégies thérapeutiques envisageables au cours de ces infections virales congénitales. Néanmoins, le rôle joué par l'activation microgliale doit encore être précisé dans le cadre des déficits auditifs engendrés par le CMV et implique l'utilisation de molécules exempts d'effets ototoxiques afin de pouvoir apprécier les effets de l'inhibition de cette activation sur l'audition de nos animaux.

PERSPECTIVES

Dans les paragraphes qui suivent, nous proposerons plusieurs orientations d'étude pour la poursuite de ce travail, à la fois sur le plan moléculaire cellulaire et clinique.

1. Quel est le rôle des autres acteurs possibles de la physiopathologie ?

Comme nous l'avons montré dans ce modèle, les chimiokines cellulaires et virales (dont l'expression est augmentée en présence de RCMV) constituent, compte tenu de leur implication dans le recrutement de cellules périphériques et dans l'activation des cellules résidentes, une cible privilégiée pour agir sur la dissémination virale et ses conséquences. Ainsi, à l'instar des études préliminaires réalisées avec l'anticorps neutralisant dirigé contre CCL12 et compte tenu des résultats encourageants obtenus avec les liposomes périphériques, il pourrait être intéressant de bloquer pharmacologiquement, en agissant à la périphérie des embryons, le récepteur CCR2 présent à la surface des monocytes, pour empêcher leur recrutement précoce dans le cerveau infecté par le RCMV. Cette approche permettrait ainsi de préciser le rôle possible des monocytes proinflammatoires, dans les étapes initiales de l'infection.

Une approche similaire pourrait également être envisagée en ciblant spécifiquement, toujours à la périphérie des animaux infectés, le récepteurs CX3CR1 présent à la surface des monocytes anti-inflammatoires pour évaluer les effets de l'inhibition de leur recrutement sur la dissémination du RCMV et les conséquences cliniques. Un ciblage de chimiokines d'origine virale a également été envisagé.

2. Peut-on aller plus loin dans la compréhension de la physiopathologie des troubles neurologiques constatés ?

Il serait intéressant d'explorer plus précisément les mécanismes cellulaires qui sous-tendent, dans notre modèle, l'émergence des pathologies constatées. Etant donné le rôle de la microglie dans la régulation de la neurogenèse (Cunningham 2013), dans le développement des interneurones corticaux (Squarzoni et al. 2014), et dans le contrôle de l'activité neuronale, (Li et al. 2012), nous pourrions explorer dans notre modèle, d'une part, l'impact de l'infection et de l'activation microgliale sur les propriétés électrophysiologiques des réseaux neuronaux corticaux et d'autre part, sur la genèse de nouveau neurones.

En outre, les travaux de Van den Pol et al, ont notamment montré in vitro que l'infection des astrocytes entrainerait une perturbation « à distance » de la communication entre neurones. (Ho & van den Pol 2007). En particulier, la réponse neuronale à une stimulation électrique ou au NMDA est fortement réduite en présence d'astrocytes infectés.

Ainsi, nous pourrions investiguer si l'altération de la réponse microgliale dans notre modèle aurait un impact sur la physiologie neuronale, notamment via la signalisation médiée par CX3CR1, comme cela est suggéré dans l'étude de Zhan et al. (Zhan et al. 2014) et si la neutralisation de ce récepteur réduit les symptômes cliniques chez nos animaux infectés par le RCMV.

Il serait par la suite intéressant de rechercher l'existence d'anomalies de la migration et/ou de la mise en place des interneurones GABAergiques chez nos animaux infectés par le RCMV. En effet, une perturbation dans la génération et la mise en place des interneurones GABAergiques du cortex cérébral au cours du développement peuvent être à l'origine de crises d'épilepsie (Powell 2013) et pourrait être un des mécanismes responsables de la présence de crises spontanées tonico-cloniques chez nos animaux.

3. Peut-on étendre et préciser les effets du ciblage microglial obtenus avec la doxycycline dans notre modèle ?

Dans ce modèle, l'administration de la doxycycline pendant toute la durée de la gestation est associée à la réduction significative des symptômes cliniques postnataux de nos animaux infectés par le RCMV. L'inhibition de l'activation microgliale est un des mécanismes possible, que nous avons d'ailleurs privilégié dans cette étude. Cependant, étant donné les modes d'action multiples de la doxycycline, nous ne pouvons pas exclure que cette dernière agisse aussi par d'autres voies. Afin de préciser ce point, des approches complémentaires peuvent être envisagées ; par exemple en ciblant les microRNA-124 (miR-124), qui, chez la souris, sont exclusivement exprimés par la microglie et dont la surexpression favorise le phénotype quiescent de ces cellules (Ponomarev et al. 2011). L'utilisation des techniques de transgénèse pourrait s'avérer utile, sachant que celles-ci se démocratisent de plus en plus chez le rat.

Par exemple, l'utilisation de modèles de knock-out inductibles permettant de manipuler l'expression du gène runx1 (Runt-related transcription factor 1), notamment impliqué dans la transition du phénotype amiboide vers un phénotype ramifié. (Zusso et al. 2012) (Kierdorf & Prinz 2013) constituerait une autre approche pour agir sur l'activation microgliale et en apprécier les effets sur la dissémination virale et sur la survenue de troubles neurologiques.

4. Peut-on passer de la preuve de concept à la création de protocoles plus applicable à la pathologie humaine ?

Comme nous l'avons précédemment suggéré, l'efficacité observée avec la doxycycline constitue seulement une preuve de concept et d'un point de vue thérapeutique, d'autres molécules, en particulier tolérées au cours de la grossesse doivent être envisagées. Des travaux suggèrent que les acides gras polyinsaturés (AGP) et leurs métabolites, de par leur rôle sur la neurotransmission et la réduction de la neuroinflammation, joueraient un rôle clé dans le fonctionnement cérébral et sa pathologie, (Bazinet & Layé 2014), (Vauzour et al. 2015). Il a de plus été montré que ces AGP pouvaient réduire l'activation microgliale chez le rat.(Ji et al. 2012) Dans notre modèle, nous pourrions ainsi complémenter la nourriture des rates gestantes en omega-3 et observer les effets sur la dissémination virale du RCMV d'une part et sur les conséquences cliniques d'autre part.

5. Peut-on élargir le ciblage microglial utilisé dans notre modèle à d'autres pathologies cérébrales infectieuses prénatale ?

En dehors des infections virales, la microglie est connue pour jouer un rôle crucial dans d'autres pathologies infectieuses, notamment celles causées par les bactéries, les champignons, et les parasites, susceptibles de cibler le cerveau fœtal. Certains travaux suggèrent, à l'instar de notre modèle, que la microglie peut contribuer de manière néfaste aux conséquences de l'infection cérébrale par ces pathogènes (Mariani & Kielian 2009). Dans le cas d'une infection bactérienne prénatale, il a par exemple été proposé que l'activation microgliale pouvait être à l'origine d'altérations du fonctionnement synaptique, via des processus neuroinflammatoires (Roumier et al. 2008). De fait, le ciblage de la microglie par l'une de nos approches pourrait-être envisagé dans d'autres modèles d'infection cérébrale prénatale.

6. Peut-on utiliser ce modèle de rat pour étudier les conséquences à plus long terme ?

Comme nous l'avons déjà mentionné dans l'introduction, les infections congénitales par le CMV sont, dans plus de 80% des cas, asymptomatiques. Cependant, les conséquences pathologiques à long terme et en particulier à l'âge adulte ne sont pas connues.

Un certain nombre de pathogènes susceptibles d'infecter le fœtus, notamment ceux inclus dans le groupe des TORCH sont suspectés d'être impliqués dans l'émergence, à l'âge adulte de maladies neuropsychiatriques telle que la schizophrénie.(Khandaker et al. 2012). De surcroit, il existerait un lien probable entre l'altération de la réponse microgliale prénatale et l'apparition de troubles psychiatriques.(Prinz & Priller 2014)

Par conséquent, la présence de ces troubles mériterait d'être objectivée chez nos animaux, à l'aide de test comportementaux tels que l'inhibition pré-impulsion du réflexe de sursaut, l'étude des fonctions psychomotrices et des interactions sociales (Powell & Miyakawa 2006).

ANNEXES

PRRT2 links infantile convulsions and paroxysmal dyskinesia with migraine

Robin Cloarec, MSc
Nadine Bruneau, PhD
Gabrielle Rudolf, PhD
Annick Massacrier, PhD
Manal Salmi, MSc
Marc Bataillard, MD
Clotilde Boulay, MD
Roberto Caraballo, MD
Natalio Fejerman, MD
Pierre Genton, MD
Edouard Hirsch, MD
Alasdair Hunter, MD
Gaetan Lesca, MD, PhD
Jacques Motte, MD
Agathe Roubertie, MD, PhD
Damien Sanlaville, MD, PhD
Sau-Wei Wong, MD
Ying-Hui Fu, PhD
Jacques Rochette, MD, PhD
Louis J. Ptáček, MD
Pierre Szepetowski, MD, PhD

ABSTRACT

Objective: Whole genome sequencing and the screening of 103 families recently led us to identify *PRRT2* (proline-rich-transmembrane protein) as the gene causing infantile convulsions (IC) with paroxysmal kinesigenic dyskinesia (PKD) (PKD/IC syndrome, formerly ICCA). There is interfamilial and intrafamilial variability and the patients may have IC or PKD. Association of IC with hemiplegic migraine (HM) has also been reported. In order to explore the mutational and clinical spectra, we analyzed 34 additional families with either typical PKD/IC or PKD/IC with migraine.

Methods: We performed Sanger sequencing of all *PRRT2* coding exons and of exon-intron boundaries in the probands and in their relatives whenever appropriate.

Results: Two known and 2 novel *PRRT2* mutations were detected in 18 families. The p.R217Pfs*8 recurrent mutation was found in ≈50% of typical PKD/IC, and the unreported p.R145Gfs*31 in one more typical family. *PRRT2* mutations were also found in PKD/IC with migraine: p.R217Pfs*8 cosegregated with PKD associated with HM in one family, and was also detected in one IC patient having migraine with aura, in related PKD/IC familial patients having migraine without aura, and in one sporadic migraineur with abnormal MRI. Previously reported p.R240X was found in one patient with PKD with migraine without aura. The novel frameshift p.S248Afs*65 was identified in a PKD/IC family member with IC and migraine with aura.

Conclusions: We extend the spectrum of *PRRT2* mutations and phenotypes to HM and to other types of migraine in the context of PKD/IC, and emphasize the phenotypic pleiotropy seen in patients with *PRRT2* mutations. ***Neurology*® 2012;79:2097–2103**

GLOSSARY

HM = hemiplegic migraine; **IC** = infantile convulsion; **PKD** = paroxysmal kinesigenic dyskinesia; **PNKD** = paroxysmal nonkinesigenic dyskinesia.

There is a long known relationship between human epilepsies and other paroxysmal brain disorders, such as migraine, episodic ataxia, or paroxysmal dyskinesia—the occurrence of involuntary movements, whether spontaneous or triggered by various types of stimuli. Evidence for shared pathophysiologic mechanisms underlying the concurrence of benign infantile convulsions (IC) and of paroxysmal kinesigenic dyskinesia (PKD) in the same patients or families was obtained more than 15 years ago.[1,2] This defined the autosomal dominant PKD/IC syndrome,[3] formerly known as ICCA (infantile convulsions and paroxysmal choreoathetosis, MIM 602066).[1] IC (or benign infantile seizures) are nonfebrile seizures with onset between 3 and 12 months of age and have a favorable outcome. Patients may develop PKD later in life. In

Correspondence & reprint requests to Dr. Szepetowski: szepetowski@inmed.univ-mrs.fr

Editorial, page 2086

See pages 2104, 2109, 2115, 2122, and 2154

Supplemental data at www.neurology.org

Supplemental Data

From the Institut de Neurobiologie de la Méditerranée (INMED) (R.C., N.B., A.M., M.S., P.G., P.S.), Marseille; INSERM UMR_S901 (R.C., N.B., A.M., M.S., P.G., P.S.), Marseille; Université d'Aix-Marseille (R.C., N.B., A.M., M.S., P.S.), Marseille; Service de Neurologie (G.R., M.B., C.B., E.H.), Hôpitaux Universitaires de Strasbourg, Strasbourg, France; Department of Neurology (R.C., N.F.), Juan P. Garrahan Pediatric Hospital, Buenos Aires, Argentina; Hôpital Henri Gastaut (P.G.), Marseille, France; Children's Hospital of Eastern Ontario (A.H.), Ottawa, Canada; Service de Cytogénétique Constitutionnelle (G.L., D.S.), Hospices Civils de Lyon, Lyon; Université Claude Bernard Lyon 1 (G.L., D.S.), Lyon; CRNL (G.L., D.S.), CNRS UMR 5292, INSERM U1028, Lyon; Département de Neuro-Pédiatrie (J.M.), American Memorial Hospital, Reims; Département de Neuro-Pédiatrie (A.R.), Hôpital Gui de Chauliac, Hôpitaux Universitaires, Montpellier; INSERM U827 (A.R.), Institut Universitaire de Recherche Clinique, Montpellier; INSERM U1051 (A.R.), Institut des Neurosciences, Montpellier, France; Department of Pediatrics (S.W.-W.), Universiti Kebangsaan Malaysia, Kuala Lumpur, Malaysia; Department of Neurology (Y.-H.F., L.J.P.) and Howard Hughes Medical Institute (L.J.P.), University of California San Francisco, San Francisco; International Paroxysmal Kinesigenic Dyskinesia/Infantile Convulsions Collaborative Working Group (Y.-H.F., L.J.P., P.S.); INSERM UMR925 (J.R.), Amiens; and Unité de Neuro-Pédiatrie (J.R.), Université de Picardie Jules Verne, Amiens, France.

Study funding: Funding information is provided at the end of the article.

Go to Neurology.org for full disclosures. Disclosures deemed relevant by the authors, if any, are provided at the end of this article.

© 2012 American Academy of Neurology

© 2012 American Academy of Neurology. Unauthorized reproduction of this article is prohibited.

PKD/IC families, individuals who inherited the disease haplotypes had PKD, IC, or both. Linkage of pure autosomal dominant IC at the same genetic 16p12-q12 locus was obtained.[4] Familial association of IC with hemiplegic migraine (HM) has also been reported.[5]

Mutations in the *PRRT2* gene were very recently identified via exome or whole genome sequencing in PKD[6–8] and in PKD/IC and IC patients and families.[9,10] *PRRT2* encodes a proline-rich transmembrane protein of unknown function. Interaction with synaptosomal-associated protein 25 (SNAP25)[9] suggests a role in the fusion of synaptic vesicles to the plasma membrane. *PRRT2* mutations identified so far include a recurrent and most frequent frameshift mutation (c.649_650insC, p.R217Pfs*8) found in most well-characterized PKD or IC families and in less well-characterized patients or families.[6–10] Lack of mutant protein expression suggested a loss-of-function mechanism.[9]

Altogether, the existence of interfamilial and intrafamilial variability in the phenotypes associated with *PRRT2* mutations, and specifically with the most frequent p.R217Pfs*8, raised the question of the possible extension of the mutational and phenotypic spectra. In the present study, the phenotype spectrum was extended to PKD with HM and *PRRT2* mutations were also identified in PKD/IC family members with more typical and frequent forms of migraine, and in one sporadic patient having complex migrainous disorder with MRI abnormalities.

METHODS

Patients and families. Patients and family members reported in this study gave written informed consent and were all collected according to appropriate ethical guidelines and committees (CPPRB 09/40–n°AC-2008-438/n°DC-2009-1002). A subset of the families have been previously reported.[4,11] Inclusion criteria were the variable association of IC (afebrile seizures with onset at age 3–12 months without recognized etiology and with a favorable outcome) with PKD later in life (attacks of involuntary movements, usually of short duration, from seconds to minutes, and precipitated by other sudden movements such as standing up from a sitting position or being startled) (appendix e-1 on the *Neurology*® Web site at www.neurology.org). Patients with pure PNKD (paroxysmal nonkinesigenic dyskinesia) or with pure paroxysmal exercise-induced dyskinesia were not included. PKD/IC families were classified as typical when no other neurologic symptom was found in any of the patients. For those PKD/IC families with various types of migraine (so-called atypical PKD/IC families), the diagnosis and classification of migraine were performed according to consensus guidelines according to the International classification. Apart from the aforementioned symptoms, neurologic workups were normal, including interictal EEGs that were performed in a subset of the patients according to the international 10-20 system.

Sanger sequencing. DNA was extracted from whole blood according to standard procedures. The coding exons and the exon-intron boundaries of *PRRT2* (Genbank NM_145239, AK292393) were screened for mutations by Sanger sequencing of genomic DNA. In family P2315 where PKD and HM cosegregated (figure 1), the coding exons and the exon-intron boundaries of the 3 known HM genes[12] (*ATP1A2*: Genbank NM_000702; *CACNA1A*: Genbank NM_000068, NM_023035, NM_001127221, NM_001174080, NM_001127222; *SCN1A*: Genbank NM_006920, NM_001165963, NM_001165964) were also screened. Fifty-microliter PCR reactions were carried out with 80 ng of genomic DNA and 10 pmol of each pair of forward and reverse *PRRT2* primers, using AccuPrime GC-Rich DNA Polymerase (Life Technologies). Primer pairs are available upon request. All PCR products were purified and both strands were sequenced at GATC Biotech (http://www.gatc-biotech.com/) and the data were analyzed with the Genalys 3.0 software.

Array comparative genomic hybridization experiment. Array comparative genomic hybridization experiment was performed on one patient (II-2) from the P2315 PKD/HM family, using a 180K oligonucleotide microarray (SurePrint G3 Human CGH Microarray Kit, 4 x 180K, Agilent Technologies, CA) as previously described.[13]

Standard protocol approvals, registrations, and patient consents. All experiments were conducted in accordance with the Declaration of Helsinki and all procedures were carried out with the adequate understanding and written consent of the subjects, and after approval from the appropriate ethical committees (CPPRB 09/40–n°AC-2008-438/n°DC-2009-1002).

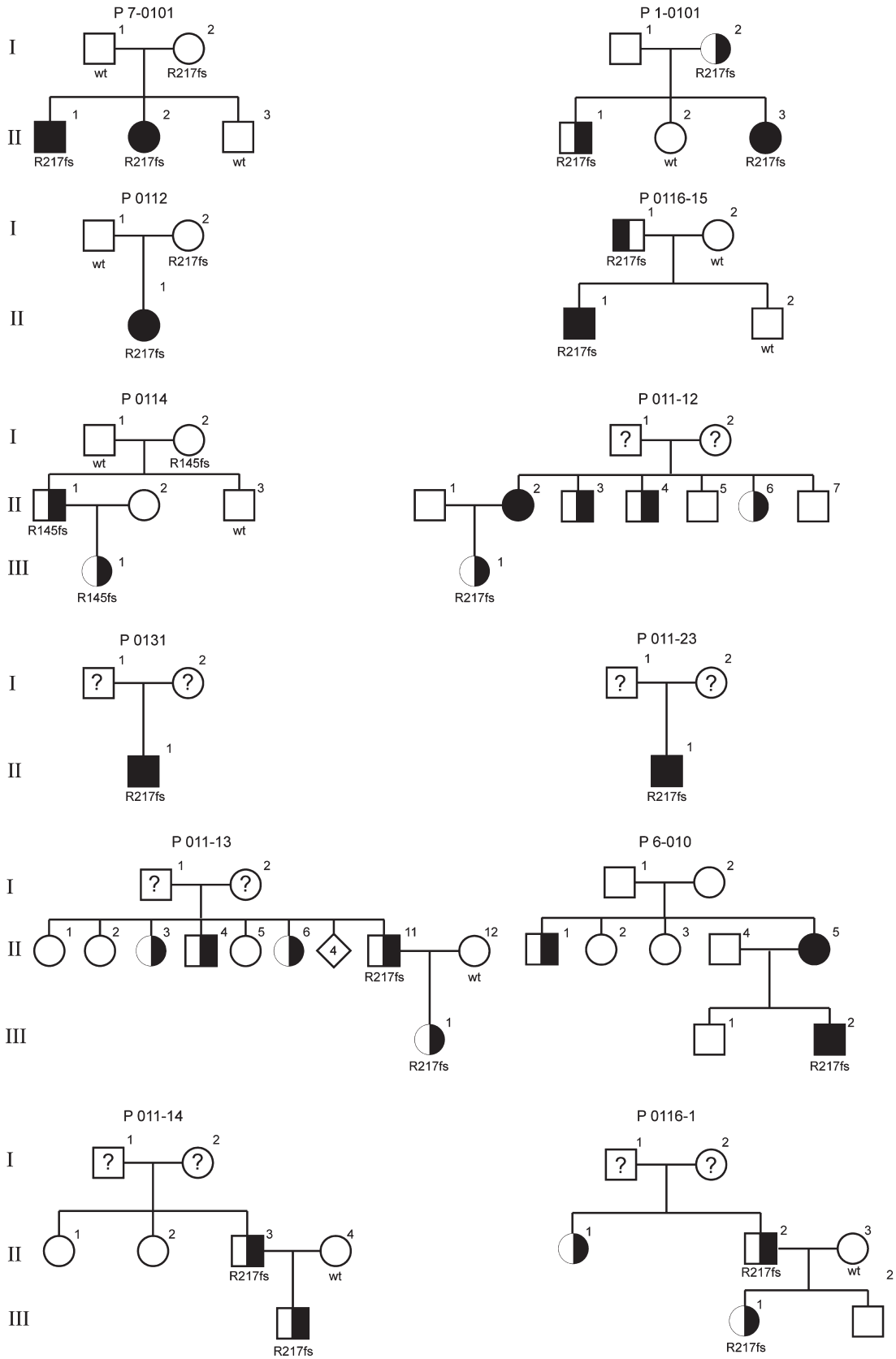
RESULTS AND DISCUSSION

***PRRT2* mutations in typical PKD/IC.** The recurrent frameshift and disease-causing mutation (c.649_650insC, p.R217Pfs*8) was found in 11 typical patients and families. A novel frameshift mutation (c.434delC, p.R145Gfs*31) was detected in family P0114. In total, *PRRT2* mutations were found in 12 of 24 (50%) patients or families with typical PKD/IC syndrome (figure 1, table). This is fully consistent with the formerly reported prevalence (52/103) of *PRRT2* mutations in PKD/IC.[9] PKD and IC showed variable expression and some individuals were also unaffected carriers. Mutations in noncoding sequences or genomic rearrangements of the *PRRT2* gene cannot be excluded in the 12 remaining typical families. In 3 of them, missense variations (c.C413G, p.P138A; c.G687A, p.R229K; c.C836T, p.P279S) were found but did not segregate in other patients (data not shown). Eight of these 12 were pure IC families, where genetic heterogeneity has long been known.[2]

***PRRT2* mutations in PKD/IC with various types of migraine.** The clinical spectrum of the recurrent p.R217Pfs*8 *PRRT2* mutation was extended to the syndrome of PKD associated with HM in family P2315 (figure 2, figure 3, table). HM is a very rare subtype of migraine that shows sporadic or autosomal dominant

© 2012 American Academy of Neurology. Unauthorized reproduction of this article is prohibited.

Figure 1 ***PRRT2*** **mutations in 12 families with typical PKD/IC**



Females are represented by circles, males by squares. Left half-filled symbols are patients with paroxysmal kinesigenic dyskinesia (PKD). Right half-filled symbols are patients with infantile convulsions (IC). Empty symbols are unaffected individuals. Family number is indicated at the top of each pedigree. DNA from family members with no indication on the mutation status was not available. wt = wild-type. For convenience, names of frameshift mutations have been simplified (R217fs is p.R217Pfs*8, R145fs is p.R145Gfs*31).

© 2012 American Academy of Neurology. Unauthorized reproduction of this article is prohibited.

Table Summary of *PRRT2* mutations detected in 18 patients and families with PKD/IC and related phenotypes

Pedigree	Phenotypes	Other features	*PRRT2* mutation	Ethnic origin
P7-0101	PKD/IC	Poland anomaly (patient II-2)	p.R217Pfs*8	Canadian Caucasian
P1-0101	PKD/IC	—	p.R217Pfs*8	French Caucasian
P0111	PKD/IC/MWA	—	p.R217Pfs*8	French Caucasian
P0112	PKD/IC	—	p.R217Pfs*8	French Caucasian
P0113	PKD/IC/MWOA	—	p.R217Pfs*8	Malaysian Asiatic
P0114	IC	—	p.R145Gfs*31[a]	French Caucasian
P0115[a]	PKD/MWA	—	p.R240X	French Caucasian
P0116-1	IC	—	p.R217Pfs*8	Argentinian Caucasian
P0116-12[a]	PKD/IC/MWA	GTCS (patient IV-1)	pS248Afs*65[a]	French Caucasian
P0116-15	PKD/IC	—	p.R217Pfs*8	French Caucasian
P011-12	PKD/IC	—	p.R217Pfs*8	Laotian Asiatic
P011-13	PKD/IC	RE (patient III-1)	p.R217Pfs*8	Argentinian Caucasian
P0131	PKD/IC	—	p.R217Pfs*8	Italian Caucasian
P4604[a]	PKD/MWOA	GTCS (patient III-1)	p.R217Pfs*8	French Caucasian
P011-14	IC	—	p.R217Pfs*8	Argentinian Caucasian
P6-010	PKD/IC	—	p.R217Pfs*8	Malaysian Asiatic/Canadian Caucasian
P2315[a]	PKD/HM	—	p.R217Pfs*8	French Caucasian
P011-23	PKD/IC	—	p.R217Pfs*8	Malaysian Asiatic

Abbreviations: GTCS = generalized tonic-clonic seizure; HM = hemiplegic migraine; IC = infantile convulsion; MWA = migraine with aura; MWOA = migraine without aura; PKD = paroxysmal kinesigenic dyskinesia; RE = rolandic epilepsy.
[a] The 6 pedigrees with various types of migraine and the 2 novel mutations reported in the present study.

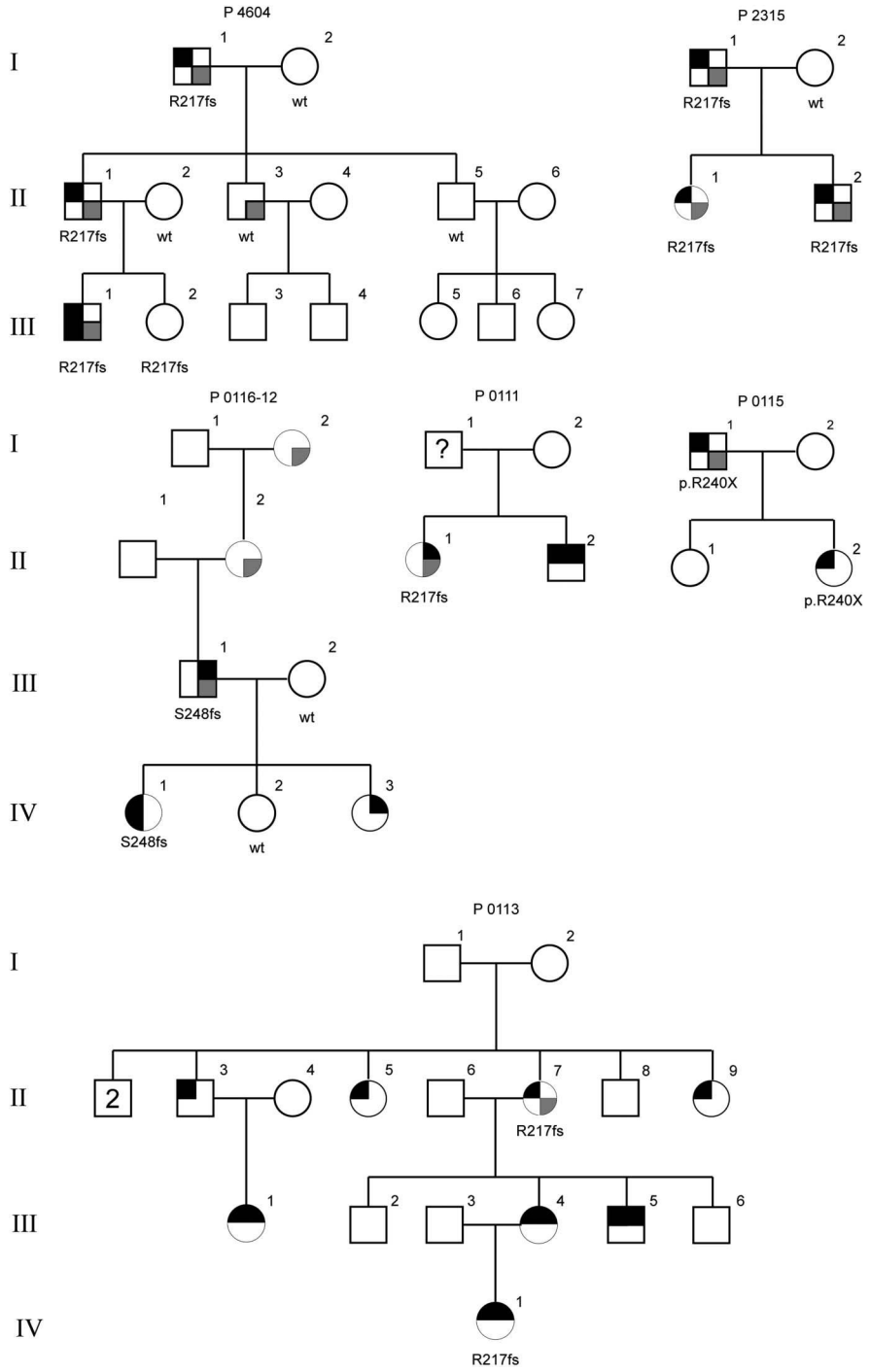
inheritance. Mutations in 3 genes (*ATP1A2*, *CACNA1A*, *SCN1A*) explain about 3/4 of familial patients and a minority of sporadic patients.[12] One *ATP1A2* mutation has also been found in a family with IC and HM.[5] In the P2315 PKD/HM family having the recurrent *PRRT2* mutation, neither a mutation in the 3 aforementioned HM genes nor a pathogenic genomic alteration were detected by Sanger sequencing and by array CGH, respectively (data not shown). The variation in phenotype between families with the same *PRRT2* mutation emphasizes the clinical and genetic links between PKD, IC, and HM. How p.R217Pfs*8 causes the broad and variable phenotype of pure PKD, pure IC, mixed PKD/IC, and mixed PKD/HM is thus far unknown. The genetic defects reported so far in PKD/IC and in HM, and in PNKD, may all lead to altered synaptic functioning.[9,14]

The recurrent p.R217Pfs*8 mutation was detected in another family (P4604) in 3 patients with PKD and migraine without aura (figure 2). One more patient in this family (II-3) who experienced migraine without aura did not inherit the mutation; he did not have PKD and might well be a phenocopy (overall prevalence of migraine is 6% in males). p.R217Pfs*8 was also found in one patient (family P0111) who had IC and migraine with visual aura and with transient speech difficulties. In addition, pR217Pfs*8 was detected in one patient (PKD/IC family P0113) having PKD and reporting migraine without aura. The previously reported p.R240X (c.C719T) nonsense mutation[9] was also found in one family (P0115) member having PKD and migraine without aura. A novel *PRRT2* frameshift mutation (c.742delC, p.S248Afs*65) was found in 3 patients (family P0116-12): one had IC only, the other had PKD and GTCS, and the third had IC and migraine with visual and aphasic aura. This and the other novel p.R145Gfs*31 mutation mentioned above were absent from current databases (1000 genomes database, NCBI SNP database) and from an additional series of 95 (p.R145Gfs*31) and 200 (p.S248Afs*65) control individuals of same ethnic origin.

The detection of *PRRT2* mutations in 6 PKD/IC-related families with different forms of migraine including the very rare hemiplegic type, the well-known links between IC and HM, and the increased risk of migraine in PNKD patients (Ptáček, unpublished data) argue in favor of a nonspurious association of typical migraine in the context of familial PKD/IC with *PRRT2* mutations. Indeed, the proportion of migraineurs among *PRRT2* mutation carriers (10/37) was significantly increased as compared with the overall migraine prevalence ($\approx$12%) ($p = 0.02$, 2-tailed binomial test). This was even highly significant when only the male carriers were considered (7/19 carriers vs $\approx$6% in general population, $p = 0.00015$, 2-tailed binomial test). The link between *PRRT2* and migraine

© 2012 American Academy of Neurology. Unauthorized reproduction of this article is prohibited.

Figure 2 ***PRRT2*** **mutations in 6 PKD/IC pedigrees with various types of migraine**

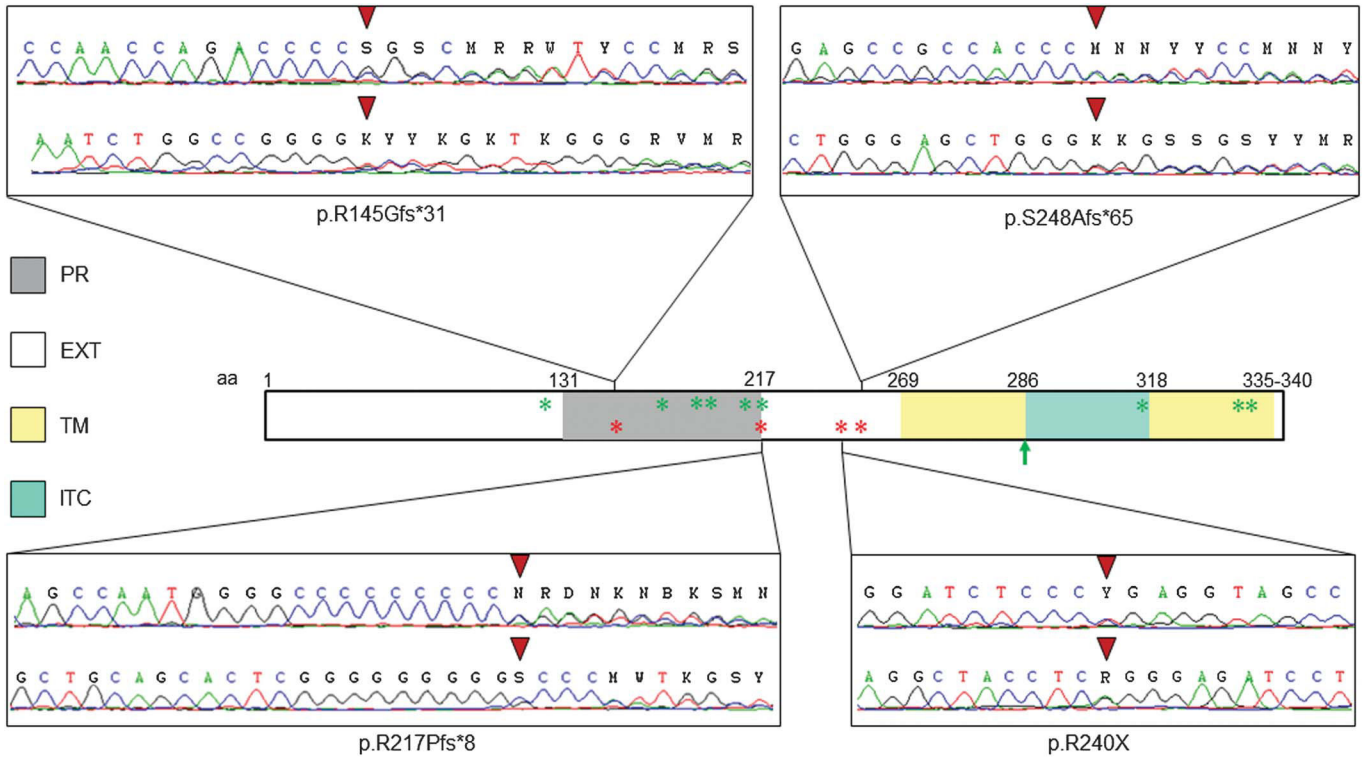


Females are represented by circles, males by squares. Top left quarter-filled symbols are patients with paroxysmal kinesigenic dyskinesia (PKD). Top right quarter-filled symbols are patients with infantile convulsions (IC). Bottom left quarter-filled symbols indicate patients with generalized tonic-clonic seizures. Bottom right quarter-filled gray symbols are patients with various types of migraine: without aura (P0113, P0115, P4604), with visual aura (P0111, P0116-12), hemiplegic (P2315). Empty symbols are unaffected individuals. Family number is indicated at the top of each pedigree. DNAs from family members with no indication on the mutation status were not available. wt = wild-type. For convenience, names of frameshift mutations have been simplified (R217fs is p.R217Pfs*8, S248fs is p.S248Afs*65).

was also further strengthened by an independent study where *PRRT2* mutations are also found in several PKD families with various types of migraine, including the rare hemiplegic type (Gardiner et al., unpublished). That *PRRT2* might participate indifferent migraine types is not surprising, given the previously reported overlaps between HM, migraine with aura, and migraine without aura,[12,16] on the one hand, and the paroxysmal characteristics shared by the other *PRRT2*-related brain disorders on the other hand. To further evaluate the

© 2012 American Academy of Neurology. Unauthorized reproduction of this article is prohibited.

Figure 3 Four frameshift and nonsense *PRRT2* mutations detected in the present study



The PRRT2 protein is from N to C-terminus. Locations of the proline-rich (PR) and transmembrane (TM) domains and of the extracellular (EXT) and intracellular (ITC) parts are indicated. Sequencing traces (both strands) corresponding to each mutation reported here (red asterisks) are shown. The locations of other PRRT2 mutations reported so far[6–10] are indicated from N to C-terminus. Green asterisks: p.S124Vfs*10, p.Q163X, p.S172Rfs*3, p.E173X, p.A211Sfs*14, p.S317N, p.V325Sfs*12, p.I327Ifs*14; green arrow (splice site mutations): c.879+1G>T, c.879+5G>A. aa = aminoacid.

spectrum of *PRRT2* mutations, we screened a cohort of 49 patients with various types of migraine. The recurrent and disease-causing p.R217fs*8 mutation was detected in one woman (patient DL93) with type I diabetes and having migraine that started at age 48 years with complex sensitive aura (left hemifacial anesthesia), auditory aura (tinnitus), and swallowing difficulties; she had MRI abnormalities consisting of nodular hypersignals in the periventricular white matter (data not shown). Of note, she had no family history of PKD or IC.

In this study, the spectrum of *PRRT2* mutations was expanded to 2 novel mutations: p.R145Gfs*31 and p.S248Afs*65. Twelve other *PRRT2* mutations, including the 2 that were also found here (p.R217fs*8, p.R240X), had been reported so far[6–10] (figure 3). The 2 novel mutations detected here are frameshift and, in line with other *PRRT2* mutations including the recurrent p.R217fs*8, are thus likely to cause loss of function. The remarkable interfamilial and intrafamilial pleiotropy seen in patients with various *PRRT2* mutations might depend on a complex interplay between a given mutant allele, the genetic background of each individual including genes with synaptic functions, the neighboring genomic context,[13] and the influence of nongenetic factors. Our study also extends the phenotypic spectrum of *PRRT2* mutations to HM and to other migraine subtypes in the context of PKD/IC families. The recurrent *PRRT2* mutation was also detected in one sporadic migraineur with abnormal MRI. A further search for *PRRT2* mutations in pure HM and in much larger cohorts of patients with more frequent types of migraine will be of great interest. Overall our data add novel insights into the multiple and somehow uncharacterized relationships existing between various paroxysmal brain disorders.

AUTHOR CONTRIBUTIONS

R. Cloarec performed the genetic experiments, analyzed the genetic data, and participated in the drafting and revision of the manuscript. N. Bruneau performed the genetic experiments and analyzed the genetic data. G. Rudolf performed the genetic experiments and analyzed the genetic data. A. Massacrier performed the genetic experiments and analyzed the genetic data. M. Salmi performed the genetic experiments and analyzed the genetic data. M. Bataillard performed the phenotyping, participated in the DNA collection, and analyzed the clinical data. C. Boulay performed the phenotyping, participated in the DNA collection, and analyzed the clinical data. R. Caraballo performed the phenotyping, participated in the DNA collection, and analyzed the clinical data. N. Fejerman performed the phenotyping, participated in the DNA collection, and analyzed the clinical data. P. Genton performed the phenotyping, participated in the DNA collection, and analyzed the clinical data. E. Hirsch performed the phenotyping, participated in the DNA collection, and analyzed the clinical data. A. Hunter performed the phenotyping, participated in the DNA collection, and analyzed the clinical data. G.

© 2012 American Academy of Neurology. Unauthorized reproduction of this article is prohibited.

Lesca performed the phenotyping and genetic analyzes, participated in the DNA collection, and analyzed the clinical and genetic data. J. Motte performed the phenotyping, participated in the DNA collection, and analyzed the clinical data. A. Roubertie performed the phenotyping, participated in the DNA collection, and analyzed the clinical data. D. Sanlaville performed the genetic experiments and analyzed the data. S.-W. Wong performed the phenotyping, participated in the DNA collection, and analyzed the clinical data. Y.-H. Fu participated in the design of the study and the revision of the manuscript. J. Rochette performed the phenotyping, participated in the DNA collection and analyzed the clinical data, and participated in the design of the study. L.J. Ptáček participated in the design of the study and the drafting of the manuscript. P. Szepetowski participated in the design of the study, analyzed the data, and drafted and revised the manuscript.

ACKNOWLEDGMENT

The authors thank the patients and controls for their participation in this study; Pr. P. Berquin, Pr. C. Marescaux, Dr. N. André-Obadia, and Dr. J. de Bellescize for help in patient collection and phenotyping; and the Cell culture and DNA library at CRICM, Paris, France, and the Biological Resource Centre, Hospices Civils, Lyon, France, for assistance.

STUDY FUNDING

Supported by INSERM (Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale) (P.S.), ANR (Agence Nationale de la Recherche) grant EPILAND (P.S.), Eurobiomed (P.S.), and the Sandler Neurogenetics Fund (Y.-H.F., L. J.P.). R.C. is a recipient of an INSERM/PACA (Provence-Alpes-Côte d'Azur) Regional Council PhD fellowship.

DISCLOSURE

R. Cloarec is a recipient of an institutional INSERM/PACA (Provence-Alpes-Côte d'Azur) Regional Council PhD fellowship. N. Bruneau, G. Rudolf, A. Massacrier, M. Salmi, M. Bataillard, C. Boulay, R. Caraballo, and N. Fejerman report no disclosures. P. Genton is a consultant for UCB-Pharma, Sanofi, and Eisai. E. Hirsch received a National Clinical Research grant (2010 N°03-08). He is a consultant for UCB-Pharma and for GlaxoSmithKline. A. Hunter is a Locum medical geneticist in patient care. G. Lesca, J. Motte, A. Roubertie, D. Sanlaville, S.-W. Wong, Y.-H. Fu, and J. Rochette report no disclosures. L.J. Ptáček received research support from the Howard Hughes Medical Institute and from the Sandler Neurogenetics Fund. P. Szepetowski received institutional research grants from French Ministry of Research (Agence Nationale de la Recherche, ANR grants EPICOGN and EPILAND) and from Provence-Alpes-Côte d'Azur Regional Council, and received institutional research support from INSERM (Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale). **Go to Neurology.org for full disclosures.**

Received January 3, 2012. Accepted in final form April 10, 2012.

REFERENCES

1. Szepetowski P, Rochette J, Berquin P, Piussan C, Lathrop GM, Monaco AP. Familial infantile convulsions and paroxysmal choreoathetosis: a new neurological syndrome linked to the pericentromeric region of human chromosome 16. Am J Hum Genet 1997;61:889–898.
2. Rochette J, Roll P, Szepetowski P. Genetics of infantile seizures with paroxysmal dyskinesia: the infantile convulsions and choreoathetosis (ICCA) and ICCA-related syndromes. J Med Genet 2008;45:773–779.
3. Bruno MK, Hallett M, Gwinn-Hardy K, et al. Clinical evaluation of idiopathic paroxysmal kinesigenic dyskinesia: new diagnostic criteria. Neurology 2004;63:2280–2287.
4. Caraballo R, Pavek S, Lemainque A, et al. Linkage of benign familial infantile convulsions to chromosome 16p12-q12 suggests allelism to the infantile convulsions and choreoathetosis syndrome. Am J Hum Genet 2001; 68:788–794.
5. Vanmolkot KR, Kors EE, Hottenga JJ, et al. Novel mutations in the Na+, K+-ATPase pump gene *ATP1A2* associated with familial hemiplegic migraine and benign familial infantile convulsions. Ann Neurol 2003;54:360–366.
6. Chen WJ, Lin Y, Xiong ZQ, et al. Exome sequencing identifies truncating mutations in *PRRT2* that cause paroxysmal kinesigenic dyskinesia. Nat Genet 2011;43:1252–1255.
7. Wang JL, Cao L, Li XH, et al. Identification of *PRRT2* as the causative gene of paroxysmal kinesigenic dyskinesias. Brain 2011;134:3490–3498
8. Li J, Zhu X, Wang X, et al. Targeted genomic sequencing identifies *PRRT2* mutations as a cause of paroxysmal kinesigenic choreoathetosis. J Med Genet 2012;49:76–78.
9. Lee HY, Huang Y, Bruneau N, et al. Mutations in the novel protein PRRT2 cause paroxysmal kinesigenic dyskinesia with infantile convulsions. Cell Reports 2012;1:2–12.
10. Heron SE, Grinton BE, Kivity S, et al. *PRRT2* mutations cause benign familial infantile epilepsy and infantile convulsions with choreoathetosis syndrome. Am J Hum Genet 2012;90:152–160.
11. Rochette J, Roll P, Fu YH, et al. Novel familial cases of ICCA (infantile convulsions with paroxysmal choreoathetosis) syndrome. Epileptic Disord 2010;12:199–204.
12. Russell MB, Ducros A. Sporadic and familial hemiplegic migraine: pathophysiological mechanisms, clinical characteristics, diagnosis, and management. Lancet Neurol 2011; 10:457–470.
13. Roll P, Sanlaville D, Cillario J, et al. Infantile convulsions with paroxysmal dyskinesia (ICCA syndrome) and copy number variation at human chromosome 16p11. PLoS One 2010;5:e13750.
14. Lee HY, Nakayama J, Xu Y, et al. Dopamine dysregulation in a mouse model of paroxysmal nonkinesigenic dyskinesia. J Clin Invest 2012;122:507–518.
15. Gardiner AR, Bhatia KP, Stamelou M, et al. *PRRT2* gene mutations: from paroxysmal dyskinesia to episodic ataxia and hemiplegic migraine. Neurology 2012;79:2115–2121.
16. Launer TJ, Terwindt GM, Ferrari MD. The prevalence and characteristics of migraine in a population-based cohort: the GEM study. Neurology 1999;53:537–542.

© 2012 American Academy of Neurology. Unauthorized reproduction of this article is prohibited.

FULL-LENGTH ORIGINAL RESEARCH

A subset of genomic alterations detected in rolandic epilepsies contains candidate or known epilepsy genes including *GRIN2A* and *PRRT2*

*†‡[1]Sarra Dimassi, *§[1]Audrey Labalme, *†‡§[1]Gaetan Lesca, §¶**[1]Gabrielle Rudolf, §†††‡§§Nadine Bruneau, §¶Edouard Hirsch, ‡§¶¶Alexis Arzimanoglou, §***Jacques Motte, §†††Anne de Saint Martin, †‡§‡‡‡Nadia Boutry-Kryza, §†††‡§§Robin Cloarec, ***Afaf Benitto, ***Agnès Ameil, *†‡Patrick Edery, †‡§§§§Philippe Ryvlin, §¶¶Julitta De Bellescize, §†††‡§§Pierre Szepetowski, and *†‡§Damien Sanlaville

Epilepsia, 55(2):370–378, 2014
doi: 10.1111/epi.12502



Sarra Dimassi, MD-PhD student working under the supervision of the departments of cytogenetics of Lyon (France) and Sousse (Tunisia) University Hospitals.

Summary

Objectives: **Rolandic epilepsies (REs) represent the most frequent epilepsy in childhood. Patients may experience cognitive, speech, language, reading, and behavioral issues. The genetic origin of REs has long been debated. The participation of rare copy number variations (CNVs) in the pathophysiology of various human epilepsies has been increasingly recognized. However, no systematic search for microdeletions or microduplications has been reported in RE so far.**

Methods: **Array comparative genomic hybridization (aCGH) and quantitative polymerase chain reaction (qPCR) were used to analyze the genomic status of a series of 47 unrelated RE patients who displayed various types of electroclinical manifestations.**

Results: **Thirty rare CNVs were detected in 21 RE patients. Two CNVs were de novo, 12 were inherited, and 16 were of unknown inheritance. Each CNV was unique to one given patient, except for a 16p11.2 duplication found in two patients. The CNVs of highest interest comprised or disrupted strong candidate or confirmed genes for epileptic and other neurodevelopmental disorders, including *BRWD3*, *GRIN2A*, *KCNC3*, *PRKCE*, *PRRT2*, *SHANK1*, and *TSPAN7*.**

Significance: **Patients with REs showed rare microdeletions and microduplications with high frequency and heterogeneity. Whereas only a subset of all genomic alterations found here may actually participate in the phenotype, the novel de novo events as well as several inherited CNVs contain or disrupt genes, some of which are likely to influence the emergence, the presentation, or the comorbidity of RE. The future screening of cohorts of larger size will help in detecting more de novo or recurrent events and in appreciating the possible enrichment of specific CNVs in patients with RE.**

KEY WORDS: **Rolandic epilepsy, Array-CGH, 16p11.2 duplication, *PRRT2*, *GRIN2A*.**

Accepted October 31, 2013; Early View publication December 24, 2013.

*Department of Genetics, Lyon University Hospital, Lyon, France; †Claude Bernard Lyon I University, Lyon, France; ‡CRNL, CNRS UMR 5292, INSERM U1028, Lyon, France; §The French EPILAND (Epilepsy, Language and Development) Consortium, Marseille, France; ¶Department of Neurology, Strasbourg University Hospital, Strasbourg, France; **UMR_S, INSERM U1119, Strasbourg, France; ††INSERM Unit U901, Marseille, France; ‡‡Mediterranean Institute of Neurobiology (INMED), Marseille, France; §§UMR_S901, Aix-Marseille University, Marseille, France; ¶¶Departments of Epilepsy, Sleep and Pediatric Neurophysiology (ESEFNP), University Hospitals of Lyon (HCL), Lyon, France; ***Department of Pediatry A, American Memorial Hospital, Reims University Hospital, Reims, France; †††Department of Pediatry I, Strasbourg University Hospital, Strasbourg, France; ‡‡‡Department of Molecular Genetics, Lyon University Hospital, Lyon, France; and §§§Department of Neurology, Lyon University Hospital, Lyon, France

[1]These authors contributed equally to this study.

Address correspondence to Pierre Szepetowski, Institut de Neurobiologie de la Méditerranée (INMED), Inserm U901, Parc Scientifique de Luminy, BP 13, 13273 Marseille Cedex 09, France. E-mail: pierre.szepetowski@inserm.fr or Damien Sanlaville, Groupement Hospitalier Est, Centre de Biologie et Pathologie Est, 59 Boulevard Pinel, 69677 Bron Cedex, France. E-mail: damien.sanlaville@chu-lyon.fr

Wiley Periodicals, Inc.
© 2013 International League Against Epilepsy

Rolandic epilepsies (REs), also known as benign epilepsy with centrotemporal spikes (BECTS), represent 8–23% of epilepsies in children younger than 16 years of age and are the most frequent epilepsy in childhood, with a prevalence of >1 per 1,000 and a male-to-female ratio of 3:2.[1] REs are characterized by brief and hemi-corporeal motor seizures that occur mainly during sleep, and are frequently associated with somatosensory symptoms. Usual age at onset is between 3 and 14 years and electroencephalography (EEG) is characterized by CTS. In addition to typical forms, atypical forms as defined by the existence of unusual electroclinical features have been described.[2,3] REs are at the mild end of a clinical spectrum of epileptic disorders with speech and language dysfunction.[4] This spectrum also comprises RE with verbal dyspraxia (REVD),[5,6] and two related epileptic encephalopathies known as the Landau-Kleffner syndrome (LKS; also named "acquired" epileptic aphasia) and the continuous spike-and-waves during slow-wave sleep syndrome (CSWSS), respectively. There is indeed evidence for clinical, epidemiologic, genetic, and neurodevelopmental relationships between RE on the one hand, and cognitive, speech, language, reading, behavioral issues, and other cerebral disorders such as migraine, on the other hand.

The genetic origin of RE has long been postulated and debated. Whereas relatives of children with RE show higher prevalence of epilepsy—and especially RE itself, LKS, or CSWSS, when compared to controls,[7] most RE do not follow a Mendelian mode of inheritance. Linkage to chromosome 15q14,[8] and association at 11p13[9] have been proposed; in addition, one nonsense and several missense variations in the potassium channel gene *KCNQ2* were reported in a few patients with RE.[10,11] Very recently microdeletions and exonic variations of the *RBFOX1* and *RBFOX3* splicing regulators genes were found in patients with RE.[12] In addition, a gain-of-glycosylation mutation in the Sushi-Repeat containing protein SRPX2 was found in all 10 affected members of a large multigenerational family with REVD and intellectual disability.[6] Of interest, there is cosegregation of another missense mutation in the glutamate *N*-methyl-D-aspartate (NMDA)–receptor subunit gene *GRIN2A* in most affected members of the same family.[13] This makes it possible that the two mutations cooperate in this family, and that the *SRPX2* mutation corresponds to a strong genetic risk factor with developmental consequences on the cerebral cortex,[14] rather than to a single direct cause. Indeed, *GRIN2A* genetic defects of various types were recently found in up to 20% of REVD, LKS, and CSWSS patients and families.[13,15,16] The existence of a clinical and genetic continuum from RE to LKS and CSWSS was further highlighted by the identification of both *GRIN2A* mutations and microdeletions in several patients with RE.[13,15,16]

Prior to those latter findings, the initial report on one de novo *GRIN2A* microdeletion as detected by array comparative genomic hybridization (aCGH) in a girl with sporadic LKS,[17] illustrated the power of such genomic approaches, and their complementarity with exome sequencing strategies, to highlight putative candidate genes. The participation of rare copy number variations (CNVs) in the pathophysiology of various human epilepsies has been increasingly recognized in the recent years.[18–20] Microdeletions at 15q11.2, 15q13.3, and 16p13.11 showed an estimate combined frequency of 3% in patients with genetic generalized epilepsy.[21] Such loci may also confer susceptibility to a wide range of neurodevelopmental disorders such as intellectual disability, autism, or schizophrenia.[22] The genomic analysis of patients with LKS and patients with CSWSS demonstrated that rare CNVs, notably encompassing cell adhesion genes, are overrepresented; moreover, strong putative pathogenic CNVs, including the aforementioned *GRIN2A* microdeletion, were detected.[17] In contrast, no systematic search for microdeletions or microduplications has been reported in patients with so-called "benign" RE so far. In the present study, we have analyzed by aCGH the genomic status of a first series of 47 RE patients with various electroclinical manifestations.

Patients and Methods

Patients

Patients were recruited by the Department of Neuropediatrics at Reims University Hospital, the Department of Epilepsy, Sleep and Pediatric Neurophysiology (ESEFNP) at Lyon University Hospitals (HCL), and the Department of Epileptology at Strasbourg University Hospitals. Patients with RE included in the present study had an electroclinical diagnosis of so-called "typical" or "atypical" RE (Table 1, Supplementary Table S1). They did not have any pathogenic *GRIN2A* mutation in the coding sequence or at the exon/intron boundaries as shown by Sanger sequencing performed here or previously[13]; notably, the patient who had the p.Gly295Ser missense mutation absent in control databases and of unknown functional consequence[13] was excluded from the present study.

Typical and atypical RE can be broadly distinguished upon previously recommended electroclinical criteria.[2,3] Overall the patients studied here (Table 1) showed a wide range of electroclinical manifestations with variable degree of severity. The most so-called "typical" RE patients (n = 25) displayed normal initial psychomotor development before the onset of focal seizures. The seizures typically occurred during sleep and were characterized by unilateral tongue or perioral paresthesias followed by facial tonic or clonic movements that could spread to the upper limb or evolve into a generalized tonic–clonic seizure. EEG showed typical diphasic spikes located in the centrotemporal areas (CTS) often activated during drowsiness and sleep. The other patients (n = 22) displayed various types of "atypical" features, such as an age at onset younger than the age of 3 years, the existence of neurodevelopmental abnormalities at onset, a higher frequency rate of partial or

Table 1. Clinical data and CNVs detected in 47 RE patients

Patients (gender)	Psychomotor development before onset	Age at first seizures (years)	Age at last seizures (years)	Seizure characteristics	EEG	Other neurological features	Brain MRI	CNVs	Size (kb)
RE with typical electroclinical features (n = 25)									
1 (F)	N	6	9	PS	CTS	ADHD, migraine	ND	–	
2 (F)	N	6	6	PS	CTS	Choroid papilloma	ND	–	
3 (M)	N	5	12	PS	CTS	ADHD	ND	dup13q33.3*	586
4 (F)	N	5	12	PS	CTS	None	N	–	
5 (M)	N	7	8	PS	CTS	Migraine	ND	dup19p13.3^{P}	465
6 (M)	N	8	11	PS	CTS	Behavior troubles	N	–	
7 (M)	N	7.5	13	PS	CTS	FS at 7 months, attention difficulties	ND	–	
8 (M)	N	None	None	None	CTS	ADHD	ND	–	
9 (M)	N	7	11.5	PS	CTS	Dysphasia, behavior troubles	N	dup4q13.1^{M}/del7q21.13^{P}	1560/221
10 (F)	N	10	10.5	PS	CTS	Behavior troubles, nocturnal terror	N	–	–
11 (F)	N	7	8	PS	CTS	ADHD	N	–	–
12 (M)	N	9	9	PS	CTS	None	N	–	–
13 (M)	N	8	10	GTCS	CTS	None	N	–	–
14 (M)	N	7	8	PS	CTS	Intellectual precocity	N	–	–
15 (M)	N	10	11	PS, GTCS	CTS	Migraine with visual aura	N	del3q22,1*/dup5q32*	103/39
16 (F)	N	8	12.5	PS	CTS	ADHD	N	delXq27/1q27.2*	390
17 (F)	N	7	7	PS	CTS	None	ND	del15q21.3^{M}/dup16p13.11^{M}	60/1323
18 (F)	N	5.5	6	PS, GTCS	CTS	Dysphasia, ADHD	N	del4q32.2*	185
19 (M)	N	5	12	PS	CTS	ADHD	N	–	–
20 (M)	N	3	6	PS	CTS	None	ND	–	–
21 (F)	N	5	Ongoing	PS	CTS	Attention difficulties	ND	–	–
22 (F)	N	10	14	PS	CTS	ND	N	del1q24.3^{+}/del5q22.1^{+}	74/113
23 (M)	N	6	Ongoing	PS	CTS	None	N	del19q13.33q13.41^{dn}/dup 2p21^{P}	1437/714
24 (F)	N	5	Ongoing	PS	CTS	Attention difficulties	N	del17p12^{P}	1355
25 (F)	N	9	13	PS, GTCS	CTS	VD	Hippocampi asymmetry	dup3q24q25.1*/dup6q26*	293/228
RE with atypical electroclinical features (n = 22)									
26 (M)	N	2	5	PS	CTS	ADHD	N	dupXq21.1^{dn}	155
27 (M)	Slightly delayed	5.5	Ongoing	PS	CTS	ADHD, learning difficulties	N	dup4q31.1*	121
28 (M)	N	1.5	6	PS	CTS	ADHD	N	dup22q11.21^{M}/dup22q11.21^{M}	324/116
29 (M)	Language delay	8	None	None	CTS	Moderate intellectual deficit	ND	dup16p11.2*/dup17p13.3*	546/380
30 (M)	N	5	11.5	PS	CTS, MFS, ESES	Nocturnal enuresis, ADHD	N	dupXp11.4^{M}	336
31 (F)	N	6.5	9	PS	CTS and MFS	Mother, grandmother, one maternal cousin: possible RE	ND	–	–
32 (M)	N	9	Ongoing	PS, IGE	CTS, MFS	VD	N	–	–
33 (M)	N	10.5	12		CTS	None	N	–	–

Continued

Epilepsia, 55(2):370–378, 2014
doi: 10.1111/epi.12502

Table 1. Continued.

Patients (gender)	Psychomotor development before onset	Age at first seizures (years)	Age at last seizures (years)	Seizure characteristics	EEG	Other neurological features	Brain MRI	CNVs	Size (kb)
				PS (rolandic and occipital type), GTCS					
34 (M)	N	6	14	PS, GTCS	CTS, ESES	Migraine, psychiatric troubles, ADHD	ND	–	–
35 (M)	Language delay	7	None	None	N	Dysphasia, VD	ND	del14q22.1*/dup20p12.2*	34/103
36 (F)	Global delay	5	7	PS	CTS	Attention difficulties	N	del16p13.2^{M}	47
37 (M)	Language delay	2	5	PS	CTS	Attention difficulties	ND	–	–
38 (M)	Language delay	7.5	12	PS	CTS	ADHD	ND	–	–
39 (F)	N	4.5	Ongoing	PS	CTS, ESES	Attention difficulties	N	–	–
40 (M)	Language delay	7	Ongoing	PS	CTS	Migraine, ADHD, parasomnia	Left temporal arachnoid cyst	del22q11.21*	215
41 (F)	Global delay	6.5	10	PS, GTCS	CTS	VD	N	–	–
42 (M)	Global delay	2	10	PS	CTS ESES	VD	N	dup16p11.2^{P}	546
43 (F)	N	4.5	Ongoing	GTCS	CTS, ESES	None	ND	–	–
44 (F)	Global delay	2	Ongoing	PS, GTCS	CTS	Moderate intellectual deficit, VD	ND	–	–
45 (F)	Global delay	None	None	None	CTS	Dysphasia	ND	–	–
46 (F)	Global delay	8 months	3	PS	CTS, ESES	Microcephalia, growth hormone deficiency, moderate intellectual deficit	ND	–	–
47 (F)	Global delay	5	Ongoing	None	CTS, ESES	ADHD, severe intellectual deficit	N	delXq28*	63

ADHD, attention deficit hyperactivity disorder; ESES, electrical status epilepticus during slow-wave sleep; F, female; M, male; MFS, multifocal spikes; N, normal; PS, partial seizure; CPS, complex partial seizure; CTS, centrotemporal spike; IGE, idiopathic generalized epilepsy; GTCS, generalized tonic–clonic seizure; VD, verbal dyspraxia; ND, not determined; *, unknown inheritance; ^{dn}, de novo; ^{M}, maternal inheritance; ^{P}, paternal inheritance; $^{+}$, absent in the mother.

generalized motor seizures, and/or the presence of other types of seizures (mainly epileptic negative myoclonic or atonic seizures, atypical absences, brief positive myoclonias). The EEG studies were also active during the wakening period with contralateral independent spike focus or multifocal discharges sometimes associated with a slow wave focus; spikes occurring in clusters and/or marked activation during sleep were sometimes almost compatible with the EEG criteria of electrical status epilepticus during slow-wave sleep (ESES). Generalized synchronous or asynchronous spike wave discharges could occur. Some patients developed symptoms with attention deficit and or behavioral disorders and global cognitive regression, and one patient presented with language regression indicating possible evolution toward the LKS spectrum.

Methods

DNA collection

All experiments were conducted in accordance with the Declaration of Helsinki and all procedures were carried out with the adequate understanding and written consent of the participants, and according to the appropriate ethical committees (no 05/78, CPP Strasbourg Alsace 1). Genomic DNAs were extracted from venous blood samples using a BACC3 kit (GE Healthcare, Amersham, United Kingdom).

Array CGH experiments

Oligonucleotide aCGH was performed using a 180,000 oligonucleotides microarray (SurePrint G3 Human CGH Microarray Kit, 4 × 180K, Agilent Technologies, Santa Clara, CA, U.S.A.). The median probe spacing of this microarray is about 13 kb (www.genomics.agilent.com). Briefly, 1 μg of the test DNA and 1 μg of reference DNA were hybridized using the manufacturer's protocol. Data were analyzed by Feature Extraction 10.7.3.1 software. Interpretation of results was carried out with the Genomic Workbench 5.0.14 software (Agilent Technologies, Santa Clara, CA, U.S.A.). Following parameters were used for interpretation: ADM-2, threshold: 5.0, window: 0.2 Mb, cutoff: 0.25. Statistically significant imbalances spanning a region of three sequential probes with an abnormal log 2 ratio and mapping outside known CNVs were considered aberrant.[23]

Quantitative PCR

Inheritance of all rare CNVs was studied by quantitative real-time PCR (qPCR) whenever parental DNAs were available. qPCR was performed using primers amplifying a unique sequence within each given genomic region and according to the manufacturer's recommendations with QuantiTect SYBR Green PCR Kit (Qiagen, Valencia, CA, U.S.A.) on a LightCycler (Roche Diagnostics, Mannheim, Germany). The number of alleles was quantified with the comparative threshold cycle method.[24] Primer sequences are available on request.

Multiplex Ligation Probe Amplification

Copy number quantification of *GRIN2A* exons was performed using the Multiplex Ligation Probe Amplification (MLPA) with the SALSA MLPA kit P410_A1 (MRC Holland, Amsterdam, The Netherlands), according to the manufacturer's recommendations. Data were analyzed using the Coffalyser software provided by the furnisher.

Results

aCGH was performed in all 47 patients with RE in order to detect CNVs. All CNVs showing ≥90% overlap with at least one common variant of the same type and reported in the Database of Genomic Variants (http://projects.tcag.ca/variation/) were considered as copy number polymorphisms (CNPs)[17] and were excluded from further analysis. All other 30 CNVs (thereafter designated as "rare" CNVs) detected here by aCGH were selected (Table 2). They were found in 21 patients. Eleven of those patients had typical RE and 10 had atypical RE ($p = 1$, Fisher's exact test, two-tailed). Eleven patients had one rare CNV, and 10 patients had two rare CNVs. Each rare CNV was unique to a given patient, except the 16p11.2 duplication that was found in two unrelated patients (Supplementary Figure S1A; Table 2). Two CNVs were de novo (see below), 12 rare CNVs were inherited (eight gains and four losses), and 16 were of unknown inheritance.

CNVs were considered of strong putative interest when they reached one of the following criteria: (1) they occurred de novo in sporadic cases; (2) they were of large size; (3) they were recurrent in this study or had also been found in previous studies on related neurodevelopmental disorders; (4) they contained previously reported epilepsy genes or genes involved in other neurodevelopmental disorders; (5) they contained strong candidate genes based on their role in the central nervous system (CNS). Among the genomic events of strongest interest, two rare CNVs occurred de novo in sporadic cases (Supplementary Figure S1B; Table 2): Patient 26 had a microduplication of 155 kb on chromosome Xq21.1 that disrupted the *BRWD3* gene, and patient 23 had a large microdeletion of approximately 1.4 Mb on chromosome 19q13 that encompassed numerous genes including *KCNC3* and *SHANK1*. Several inherited CNVs of large size (>1 Mb) were also found (Table 2): a 1.56 Mb duplication at 4q13.1 disrupted the *LPHN3* gene; a large (1.32 Mb) duplication at 16p13.11 that included *NDE1* and *ABCC1*; and a 17p12 microdeletion, 1.35 Mb in size, that comprised *PMP22*. The classical 16p11.2 microduplication that has been previously reported in neurocognitive disorders,[25,26] and that comprises several genes including *PRRT2* and *KCTD13*, was found here in two unrelated patients (29 and 42). Notably also, patient 36 inherited a 16p13.2 CNV that led to a partial microdeletion of *GRIN2A*. This CNV was inherited from her mother whose phenotype could not be studied. The deletion was further

Table 2. Detailed data on the 30 rare CNVs detected in 21 RE patients

Patients (gender)	Chromosomal location, coordinates (nt, build 37)	Size (kb)	Validation by qPCR	CNV type (inheritance)	Gene content
de novo CNVs					
23 (M)	19q13.33q13.41, chr19: 50,477,546–51,914,320	1437	Yes	Loss	*KCNC3, KLK5, KLK8, SHANK1, SYT3, POLD1* (+48 additional Protein-coding Ensembl genes)
26 (M)	Xq21.1, chrX: 79,975,010–80,130,433	155	Yes	Gain	*BRWD3* (trunc.)
Unknown inheritance					
22 (F)	1q24.3, chr1: 171,296,075–171,369,676	74	Yes	Loss (absent in the mother)	*FMO4* (trunc.)
15 (M)	3q22.1, chr3: 130,923,551–131,026,092	103	ND	Loss	*NEK11* (trunc.)
25 (F)	3q24q25.1, chr3: 148,802,495–149,095,057	293	ND	Gain	*CP, HLTF* (trunc., 5′UTR), *HPS3, TM4SF18, TM4SF1* (trunc.)
27 (M)	4q31.1, chr4: 140,046,128–140,167,014	121	ND	Gain	*ELF2* (trunc.)
18 (F)	4q32.2, chr4: 162,318,262–162,502,975	185	ND	Loss	*FSTL5* (trunc.)
22 (F)	5q22.1, chr5: 110,953,891–111,067,269	113	Yes	Loss (absent in the mother)	*NREP* (trunc. 5'UTR), *STARD4-AS1* (trunc.)
15 (M)	5q32, chr5: 147,261,706–147,300,349	39	ND	Gain	*SCGB3A2* (trunc.), *C5orf46*
25 (F)	6q26, chr6: 162,748,288–162,976,601	228	ND	Gain	*PARK2* (trunc.)
3 (M)	13q33.3, chr13: 108,462,797–109,048,370	586	ND	Gain	*FAM155A* (trunc.), *LIG4, ABHD13, TNFSF13B*
35 (M)	14q22.1, chr14: 53,158,913–53,192,592	34	ND	Loss	*ERO1L* (trunc.), *PSMC6* (trunc.)
29 (M)	16p11.2, chr16: 29,652,999–30,198,600	546	ND	Gain	*ERK1, INO80E, KCTD13, PRRT2, QPRT, SEZ6L2, TBX6,* (+23 additional Protein-coding Ensembl genes)
29 (M)	17p13.3, chr17: 1,113,102–1,492,475	380	ND	Gain	*YWHAE* (+8 additional Protein-coding Ensembl genes)
35 (M)	20p12.2, chr20: 9,746,022–9,849,154	103	ND	Gain	*PAK7* (trunc.)
40 (M)	22q11.21, chr22: 18,968,891–19,184,416	215	ND	Loss	*DGCR5* (trunc.), *DGCR9, DGCR2, DGCR10, DGCR14, TSSK2, GSC2, SLC25A1, CLTCL1* (trunc.)
16 (F)	Xq27.1q27.2, chrX: 140,226,100–140,616,008	390	ND	Loss	*LDOC1, SPANXC, SPANXA2-OT1* (trunc.)
47 (F)	Xq28, chrX: 148,736,043–148,798,821	63	ND	Loss	*MAGEA11* (trunc.)
Inherited CNVs					
23 (M)	2p21, chr2: 45,645,486–46,359,698	714.2	Yes	Gain (Pat)	*SRBD1* (trunc.), *PRKCE* (trunc.)
9 (M)	4q13.1, chr4: 62,517,192–64,076,461	1560	Yes	Gain (Mat)	*LPHN3* (trunc.)
9 (M)	7q21.13, chr7: 90,272,015–90,492,609	221	Yes	Loss (Pat)	*CDK14* (trunc.)
17 (F)	15q21.3, chr15: 54,819,345–54,879,670	60	Yes	Loss (Mat)	*UNC13C* (trunc.)
36 (F)	16p13.2, chr16: 9,809,522–9,856,618	47	Yes	Loss (Mat)	*GRIN2A (trunc. 5'UTR)*
17 (F)	16p13.11, chr16: 14,968,855–16,292,235	1323	Yes	Gain (Mat)	*NDE1* (+15 additional Protein-coding Ensembl genes)
42 (M)	16p11.2, chr16: 29,652,999–30,198,600	546	Yes	Gain (Pat)	*ERK1, INO80E, KCTD13, PRRT2, QPRT, SEZ6L2, TBX6,* (+23 additional Protein-coding Ensembl genes)
24 (F)	17p12, chr17: 14,100,118–15,455,297	1355	Yes	Loss (Pat)	*CDRT4* (trunc.), *CDRT7, CDRT15, COX10* (trunc.), *HS3ST3B1, MIR4731, PMP22, TEKT3*
5 (M)	19p13.3, chr19: 2,725,632–3,190,877	465	Yes	Gain (Pat)	*AES, GNA11, GNA15, NCLN* (trunc.), *SLC39A3* (trunc.), *S1PR4, SGTA, TLE2, TLE6, THOP1, ZNF554, ZNF555, ZNF556, ZNF57, ZNF77*
28 (M)	22q11.21, chr22: 18,317,622–18,641,468	324	Yes	Gain (Mat)	*MICAL3* (trunc.), *PEX26, TUBA8, USP18* (trunc.)
28 (M)	22q11.21, chr22: 20,133,609–20,249,421	116	Yes	Gain (Mat)	*MIR-1286, RTN4*R (trunc.), *ZDHHC8* (trunc.)
30 (M)	Xp11.4, chrX: 38,474,152–38,810,601	336	Yes	Gain (Mat)	*MID1IP1, TSPAN7* (trunc.)

RE, rolandic epilepsy; CNV, copy number variation; qPCR, quantitative PCR; kb, kilobase; trunc., truncated; UTR, untranslated region; F, female; M: male; Mat, maternal; Pat, paternal; ND, not done.

Epilepsia, 55(2):370–378, 2014
doi: 10.1111/epi.12502

characterized using MLPA, which confirmed the loss of exons 13 and 14 of *GRIN2A* (Figure S1C).

Discussion

Despite the previous identification of rare genetic defects that might influence RE in peculiar sporadic or familial cases, particularly in the context of coexisting brain disorders, such as neonatal seizures (*KCNQ2*)[10] or verbal dyspraxia (*SRPX2*) (REVD syndrome),[6] the genetic landscape of RE has long remained elusive. The detection of rare genomic structural alterations has long been a very powerful strategy toward the future identification of disease genes.[13,17,27,28] Indeed, we recently succeeded in identifying *GRIN2A* as a major genetic cause of the closely related LKS and CSWSS epileptic encephalopathies, and of REVD,[13] thanks to the prior detection of a de novo microdeletion in one girl with sporadic LKS.[17] Here, 47 patients presenting with RE and without any deleterious mutation in the coding sequence of *GRIN2A* were analyzed at the genomic level, using the same methodology and tools.[13] The overall picture is that of a heterogeneous genomic architecture in REs, with 30 rare CNVs identified in 21 patients (Table 1, Table 2). All but one CNV at 16p11.2 was unique to one single patient. The high frequency and heterogeneity of microdeletions and microduplications found in the present series are consistent with the genetic complexity previously suspected in RE, and with the genomic heterogeneity previously reported in the related LKS and CSWSS epileptic encephalopathies. Indeed, numerous inherited or de novo genomic variations had also been identified in a cohort of 61 patients with LKS or CSWSS.[17]

Ten patients had two rare CNVs each. Those CNVs may cooperate to influence the emergence, the presentation and the comorbidity of RE. This included patient 29 who had two microduplications at 16p11.2 and at 17p13.3, respectively. Both the duplications have been implicated in various neurodevelopmental and epileptic disorders[29–34] and contain strong candidate genes, such as *PRRT2*[35,36] and *YWHAE*,[37] respectively. Similarly, patient 23 who had a large de novo deletion at 19q13 comprising several candidate genes, including the potassium channel gene *KCNC3* and the gene for synaptic scaffolding protein SHANK1, also inherited a duplication that disrupted the epsilon protein kinase C gene (*PRKCE*). Generally, multiple CNVs, including those of unknown pathogenic significance, might result in more severe clinical presentation. Hence, it has been reported that patients carrying two large CNVs of unknown clinical significance were eight times as likely to have development delay as were controls.[38] The association with increased severity was not confirmed here, as only 3 of the 10 patients with two rare CNVs had "atypical" RE ($p = 0.3$, Fisher's exact test, two-tailed). Although it was used here for convenience, the binary distinction between "typical" and "atypical" RE clearly does not reflect the highly variable presentation and severity seen in RE patients.

Only a subset of all the CNVs as identified here might actually influence the susceptibility to RE. Among the genomic events of strongest interest, the detection of a novel 16p13.2 microdeletion disrupting *GRIN2A* in patient 36, who had RE with mild intellectual disability and a favorable outcome, confirms the involvement and the expansion of *GRIN2A* mutations to the milder end of the spectrum of epilepsies and encephalopathies with speech and language dysfunction. Indeed, a missense *GRIN2A* mutation absent in control databases had been identified in one of the 32 RE patients with electroclinical typical features studied previously,[13] and both *GRIN2A* mutations and microdeletions were found in several RE patients in an independent study.[16] The recurrence of the classical 16p11.2 microduplication in two RE patients (29 and 42) should also be highlighted; 16p11.2 microduplications have been reported previously in patients with various neurocognitive disorders and epileptic seizures.[25,26] In the largest series of patients with 16p11.2 duplications reported so far, 19% of 101 patients had epileptic seizures of various types.[39] This included West syndrome (3%) and febrile seizures (4%); seizure type was unspecified in most cases (12%). The duplicated chromosomal region contains 29 genes including *PRRT2* (proline-rich transmembrane protein 2). *PRRT2* heterozygous mutations cause a wide variety of variably associated paroxysmal cerebral disorders: benign infantile seizures (BIS), paroxysmal kinesigenic dyskinesia (PKD), and/or hemiplegic migraine.[35,36] Of interest, a link between RE and BIS, PKD or exercise-induced dystonia, has already been reported.[40,41] Another strong candidate at 16p11.2 is *KCTD13*, which encodes the polymerase delta-interacting protein 1 and has been considered an important driver of the 16p11.2 CNVs that occur in various neuroanatomic conditions.[42] It is also noteworthy that the *PRKCE* gene that was partially duplicated here in patient 23, was also disrupted by a 551-kb microduplication event in a patient with LKS.[17] In addition to *GRIN2A*, *PRKCE* might well represent a novel link between RE on the one hand, and the more severe LKS and CSWSS on the other hand. Another such link could be represented by members of the SHANK family that have been previously associated with the spectrum of autism disorders: the large de novo 19q13 deletion encompassing *SHANK1* that was found here in patient 23, strongly recalled the large 22q13 deletion previously detected in a patient with CSWSS and that contained *SHANK3*.[17] In contrast, the significant overrepresentation of cell adhesion genes of the cadherin, protocadherin, and contactin families that had been found in the series of LKS and CSWSS patients and that might well partly sustain the behavioral issues frequently seen in such patients,[17] was not found in the present series of RE patients. These and other as-yet unidentified genetic as well as nongenetic factors could underlie the

phenotypic variability seen in the clinical spectrum of RE, LKS, and CSWSS.

Two de novo CNVs were reported here in sporadic RE cases, and the corresponding genomic areas are obviously suspected to contain strong candidate genes. In contrast with the large 19q13 deletion that contained multiple interesting genes such as the aforementioned *KCNC3* and *SHANK1* genes but also *SYT3* (synaptotagmin 3) and *POLD1* (polymerase delta 1), the de novo Xq21 duplication found here in a boy (patient 26) was of small size and concerned and disrupted one single gene only: *BRWD3*. *BRWD3* encodes a protein with bromodomain and tryptophan aspartic acid dipeptide repeats, and mutations of various types (frameshift, splice site, and missense) have been reported in three families with X-linked nonsyndromic, borderline to mild intellectual deficiency[43]; of note, no epileptic seizure was reported. In addition, the Xp11.4 duplication that disrupted the *TSPAN7* tetraspanin gene, was found in a boy (patient 30) and his unaffected mother and is likely to have deleterious effects. A frameshift mutation in *TSPAN7* has been found in a family with X-linked intellectual deficiency[44]; one of the five affected individuals also had focal EEG anomalies in the left central and parietal-occipital region. Other genes contained within rare CNVs as detected here are also worth mentioning as they may well participate in the emergence, the variable presentation, or the comorbidities of RE (Table 2). As an example, the CDK14 protein interacts with the 14-3-3-epsilon protein[45] that is encoded by the *YWHAE* gene.

In conclusion, a large number of rare CNVs was detected in a first series of 47 patients with RE. Each CNV was unique to one given patient, except the *PRRT2*-containing 16p11.2 microduplication; this illustrates the high level of genomic heterogeneity in RE. *GRIN2A* was among the most interesting genes that were found here: *GRIN2A* mutations can cause up to 20% of LKS and CSWSS, and RE was found in LKS and CSWSS relatives who also carried *GRIN2A* mutations[13,15,16]; moreover, additional *GRIN2A* mutations and microdeletions were found in several RE cases.[13] Whereas the novel de novo events reported in the present series contain or disrupt genes that are likely to influence the phenotype, such as *KCNC3*, *SHANK1,* or *BRWD3*, only a subset of all the other genomic alterations found here may actually participate in the phenotype. Larger cohorts now need to be screened by aCGH to detect more de novo or recurrent events and to appreciate the possible enrichment of specific CNVs in patients with RE. Together with whole or targeted exome sequencing, such an approach should lead to a better knowledge of the genetic and genomic defects that might directly cause, or that might increase the risk to, RE, or that might contribute the phenotypic diversity and the variable outcome of the corresponding spectrum of disorders.

Acknowledgments

We would like to express our sincere gratitude to the families for their cooperation. Written informed consent was obtained from the parents for their children and for themselves, according to the appropriate bioethics laws and ethical committees (no 05/78, CPP Strasbourg Alsace 1). We thank R. Lamy for expert technical assistance. Assistance from the Biological Resource Centre, Hospices Civils, Lyon, France, was greatly appreciated. This work was supported by ANR (Agence Nationale de la Recherche) grant 'EPILAND' (ANR-2010-BLAN-1405 01) with EuroBiomed labeling, by National PHRC grant 2010 No 03-08, and by INSERM (Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale). RC is a recipient of an INSERM/PACA (Provence-Alpes-Côte d'Azur) Regional Council PhD fellowship.

Disclosure

None of the authors has any conflict of interest to disclosure. We confirm that we have read the Journal's position on issues involved in ethical publication and affirm that this report is consistent with those guidelines.

References

1. Dalla Bernardina B, Sgrò V, Fejerman N. Epilepsy with centrotemporal spikes and related syndromes. In Roger J, Bureau M, Dravet C, et al. (Eds) *Epileptic syndromes in infancy, childhood and adolescence*. 2nd ed. London: John Libbey; 2002.
2. Massa R, de Saint-Martin A, Carcangiu R, et al. EEG criteria predictive of complicated evolution in idiopathic rolandic epilepsy. *Neurology* 2001;57:1071–1079.
3. Fejerman N. Atypical rolandic epilepsy. *Epilepsia* 2009;50(Suppl. 7):9–12.
4. Rudolf G, Valenti MP, Hirsch E, et al. From rolandic epilepsy to continuous spike-and-waves during sleep and Landau-Kleffner syndromes: insights into possible genetic factors. *Epilepsia* 2009;50 (Suppl. 7):25–28.
5. Scheffer IE, Jones L, Pozzebon M, et al. Autosomal dominant rolandic epilepsy and speech dyspraxia: a new syndrome with anticipation. *Ann Neurol* 1995;38:633–642.
6. Roll P, Rudolf G, Pereira S, et al. SRPX2 mutations in disorders of language cortex and cognition. *Hum Mol Genet* 2006;15:1195–1207.
7. Vears DF, Tsai MH, Sadleir LG, et al. Clinical genetic studies in benign childhood epilepsy with centrotemporal spikes. *Epilepsia* 2012;53:319–324.
8. Neubauer BA, Fiedler B, Himmelein B, et al. Centrotemporal spikes in families with rolandic epilepsy: linkage to chromosome 15q14. *Neurology* 1998;51:1608–1612.
9. Strug LJ, Clarke T, Chiang T, et al. Centrotemporal sharp wave EEG trait in rolandic epilepsy maps to Elongator Protein Complex 4 (ELP4). *Eur J Hum Genet* 2009;17:1171–1181.
10. Singh NA, Westenskow P, Charlier C, et al. KCNQ2 and KCNQ3 potassium channel genes in benign familial neonatal convulsions: expansion of the functional and mutation spectrum. *Brain* 2003;126:2726–2737.
11. Hahn A, Neubauer BA. Sodium and potassium channel dysfunctions in rare and common idiopathic epilepsy syndromes. *Brain Dev* 2009;31:515–520.
12. Lal D, Reinthaler EM, Altmuller J, et al. RBFOX1 and RBFOX3 Mutations in Rolandic Epilepsy. *PLoS ONE* 2013;8:e73323.
13. Lesca G, Rudolf G, Bruneau N, et al. GRIN2A mutations in acquired epileptic aphasia and related childhood focal epilepsies and encephalopathies with speech and language dysfunction. *Nat Genet* 2013;45:1061–1066.
14. Salmi M, Bruneau N, Cillario J, et al. Tubacin prevents neuronal migration defects and epileptic activity caused by rat Srpx2 silencing in utero. *Brain* 2013;136:2457–2473.
15. Carvill GL, Regan BM, Yendle SC, et al. GRIN2A mutations cause epilepsy-aphasia spectrum disorders. *Nat Genet* 2013;45: 1073–1076.

16. Lemke JR, Lal D, Reinthaler EM, et al. Mutations in GRIN2A cause idiopathic focal epilepsy with rolandic spikes. *Nat Genet* 2013;45:1067–1072.
17. Lesca G, Rudolf G, Labalme A, et al. Epileptic encephalopathies of the Landau-Kleffner and continuous spike and waves during slow-wave sleep types: genomic dissection makes the link with autism. *Epilepsia* 2012;53:1526–1538.
18. Dibbens LM, Mullen S, Helbig I, et al. Familial and sporadic 15q13.3 microdeletions in idiopathic generalized epilepsy: precedent for disorders with complex inheritance. *Hum Mol Genet* 2009;18:3626–3631.
19. Helbig I, Mefford HC, Sharp AJ, et al. 15q13.3 microdeletions increase risk of idiopathic generalized epilepsy. *Nat Genet* 2009;41:160–162.
20. de Kovel CG, Trucks H, Helbig I, et al. Recurrent microdeletions at 15q11.2 and 16p13.11 predispose to idiopathic generalized epilepsies. *Brain* 2010;133:23–32.
21. Mefford HC, Mulley JC. Genetically complex epilepsies, copy number variants and syndrome constellations. *Genome Med* 2010;2:71.
22. Mulley JC, Mefford HC. Epilepsy and the new cytogenetics. *Epilepsia* 2011;52:423–432.
23. Boutry-Kryza N, Labalme A, Till M, et al. An 800 kb deletion at 17q23.2 including the MED13 (THRAP1) gene, revealed by aCGH in a patient with a SMC 17p. *Am J Med Genet A* 2012;158A: 400–405.
24. Roll P, Sanlaville D, Cillario J, et al. Infantile convulsions with paroxysmal dyskinesia (ICCA syndrome) and copy number variation at human chromosome 16p11. *PLoS ONE* 2010;5:e13750.
25. Bedoyan JK, Kumar RA, Sudi J, et al. Duplication 16p11.2 in a child with infantile seizure disorder. *Am J Med Genet A* 2010;152A:1567–1574.
26. Shinawi M, Liu P, Kang SH, et al. Recurrent reciprocal 16p11.2 rearrangements associated with global developmental delay, behavioural problems, dysmorphism, epilepsy, and abnormal head size. *J Med Genet* 2010;47:332–341.
27. Monaco AP, Bertelson CJ, Middlesworth W, et al. Detection of deletions spanning the Duchenne muscular dystrophy locus using a tightly linked DNA segment. *Nature* 1985;316:842–845.
28. Lai CS, Fisher SE, Hurst JA, et al. A forkhead-domain gene is mutated in a severe speech and language disorder. *Nature* 2001;413:519–523.
29. Bi W, Sapir T, Shchelochkov OA, et al. Increased LIS1 expression affects human and mouse brain development. *Nat Genet* 2009;41:168–177.
30. Roos L, Jonch AE, Kjaergaard S, et al. A new microduplication syndrome encompassing the region of the Miller-Dieker (17p13 deletion) syndrome. *J Med Genet* 2009;46:703–710.
31. Bruno DL, Anderlid BM, Lindstrand A, et al. Further molecular and clinical delineation of co-locating 17p13.3 microdeletions and microduplications that show distinctive phenotypes. *J Med Genet* 2010;47:299–311.
32. Shimojima K, Sugiura C, Takahashi H, et al. Genomic copy number variations at 17p13.3 and epileptogenesis. *Epilepsy Res* 2010;89:303–309.
33. Hyon C, Marlin S, Chantot-Bastaraud S, et al. A new 17p13.3 microduplication including the PAFAH1B1 and YWHAE genes resulting from an unbalanced X;17 translocation. *Eur J Med Genet* 2011;54:287–291.
34. Curry CJ, Rosenfeld JA, Grant E, et al. The duplication 17p13.3 phenotype: analysis of 21 families delineates developmental, behavioral and brain abnormalities, and rare variant phenotypes. *Am J Med Genet A* 2013;161:1833–1852.
35. Cloarec R, Bruneau N, Rudolf G, et al. PRRT2 links infantile convulsions and paroxysmal dyskinesia with migraine. *Neurology* 2012;79:2097–2103.
36. Lee YC, Lee MJ, Yu HY, et al. PRRT2 mutations in paroxysmal kinesigenic dyskinesia with infantile convulsions in a Taiwanese cohort. *PLoS ONE* 2012;7:e38543.
37. Toyo-oka K, Shionoya A, Gambello MJ, et al. 14-3-3epsilon is important for neuronal migration by binding to NUDEL: a molecular explanation for Miller-Dieker syndrome. *Nat Genet* 2003;34:274–285.
38. Girirajan S, Rosenfeld JA, Coe BP, et al. Phenotypic heterogeneity of genomic disorders and rare copy-number variants. *N Engl J Med* 2012; 367:1321–1331.
39. Jacquemont S, Reymond A, Zufferey F, et al. Mirror extreme BMI phenotypes associated with gene dosage at the chromosome 16p11.2 locus. *Nature* 2011;478:97–102.
40. Guerrini R, Bonanni P, Nardocci N, et al. Autosomal recessive rolandic epilepsy with paroxysmal exercise-induced dystonia and writer's cramp: delineation of the syndrome and gene mapping to chromosome 16p12-11.2. *Ann Neurol* 1999;45:344–352.
41. Espeche A, Cersosimo R, Caraballo RH. Benign infantile seizures and paroxysmal dyskinesia: a well-defined familial syndrome. *Seizure* 2011;20:686–691.
42. Golzio C, Willer J, Talkowski ME, et al. KCTD13 is a major driver of mirrored neuroanatomical phenotypes of the 16p11.2 copy number variant. *Nature* 2012;485:363–367.
43. Field M, Tarpey PS, Smith R, et al. Mutations in the BRWD3 gene cause X-linked mental retardation associated with macrocephaly. *Am J Hum Genet* 2007;81:367–374.
44. Abidi FE, Holinski-Feder E, Rittinger O, et al. A novel 2 bp deletion in the TM4SF2 gene is associated with MRX58. *J Med Genet* 2002;39:430–433.
45. Gao Y, Jiang M, Yang T, et al. A Cdc2-related protein kinase hPFTAIRE1 from human brain interacting with 14-3-3 proteins. *Cell Res* 2006;16:539–547.

Supporting Information

Additional Supporting Information may be found in the online version of this article:

Figure S1. (A) Array-CGH profiles of patients 42 and 29 who share a common 16p11.2 duplication, 545.6 kb in size (from 29,652,999 to 30,198,600 nt). (B) Array-CGH profiles of patient 23 showing a 19q13.33q13.41 deletion, 1.43 Mb in size (from 50,477,546 to 51,914,320 nt), and of patient 26 showing a Xq21.1 duplication, 155.4 kb in size (from 79,975,010 to 80,130,433 nt), and disrupting *BRWD3*. (C) Left: Array-CGH profile of patient 36 showing a 16p13.2 deletion, 47 kb in size (from 9,809,522 to 9,856,618 nt), and disrupting *GRIN2A*. Right: this *GRIN2A* exonic deletion was characterized by MLPA. Red squares correspond to probes for exon 13 (one probe) and exon 14 (two probes).

Table S1. Detailed clinical data of the 47 RE patients.

doi:10.1093/brain/awt161 Brain 2013: 136; 2457–2473 | 2457

BRAIN
A JOURNAL OF NEUROLOGY

Tubacin prevents neuronal migration defects and epileptic activity caused by rat *Srpx2* silencing *in utero*

Manal Salmi,[1,2,3,4,*] Nadine Bruneau,[1,2,3,4,*] Jennifer Cillario,[1,2,3,4,*] Natalia Lozovaya,[1,2,3,5] Annick Massacrier,[1,2,3,4] Emmanuelle Buhler,[1,2,3,4,6] Robin Cloarec,[1,2,3,4] Timur Tsintsadze,[1,2,3,4] Françoise Watrin,[1,2,3,4,6] Vera Tsintsadze,[1,2,3] Céline Zimmer,[3,7,8] Claude Villard,[3,9] Daniel Lafitte,[3,9] Carlos Cardoso,[1,2,3] Lan Bao,[10] Gaetan Lesca,[4,11] Gabrielle Rudolf,[4,12] Françoise Muscatelli,[1,2,3] Vanessa Pauly,[13] Ilgam Khalilov,[1,2,3,4] Pascale Durbec,[3,7,8] Yehezkel Ben-Ari,[1,2,3,4] Nail Burnashev,[1,2,3,4] Alfonso Represa[1,2,3] and Pierre Szepetowski[1,2,3,4]

1 INSERM UMR_S901, Parc Scientifique de Luminy, 13273 Marseille, France
2 Mediterranean Institute of Neurobiology (INMED), Parc Scientifique de Luminy, 13273 Marseille, France
3 Aix-Marseille University, Parc Scientifique de Luminy, 13273 Marseille, France
4 French EPILAND network, INMED, 13273 Marseille, France
5 INSERM UMR_S663, Paris Descartes University, 149 rue de Sèvres, 75015 Paris, France
6 PPGI platform, INMED, INSERM U901, Parc Scientifique de Luminy, 13273 Marseille, France
7 CNRS UMR7288, Parc Scientifique de Luminy, 13273 Marseille, France
8 Developmental Biology Institute of Marseille-Luminy (IBDML), Parc Scientifique de Luminy, 13273 Marseille, France
9 PIT2 Platform, CRO2, INSERM UMR_S911, 27 Bd J Moulin, 13385 Marseille, France
10 State Key Laboratory of Cell Biology, Institute of Biochemistry and Cell Biology, Shanghai 200031, China
11 CRNL, CNRS UMR5292, INSERM U1028 and Department of Genetics, University Hospitals of Lyon, 69621 Villeurbanne, France
12 Department of Neurology, Strasbourg University Hospital, 1 place de l'Hôpital, 67091 Strasbourg, France
13 Medical Informatics and Public Health Department, AP-HM, Sainte Marguerite Hospital, 13009 Marseille, France

*These authors contributed equally to this work.

Correspondence to: Dr Szepetowski,
Institut de Neurobiologie de la Méditerranée (INMED),
Inserm U901,
Parc Scientifique de Luminy,
BP13,
13273 Marseille Cedex 09.
E-mail: pierre.szepetowski@inserm.fr

Altered development of the human cerebral cortex can cause severe malformations with often intractable focal epileptic seizures and may participate in common pathologies, notably epilepsy. This raises important conceptual and therapeutic issues. Two missense mutations in the sushi repeat-containing protein SRPX2 had been previously identified in epileptic disorders with or without structural developmental alteration of the speech cortex. In the present study, we aimed to decipher the precise developmental role of SRPX2, to have a better knowledge on the consequences of its mutations, and to start addressing therapeutic issues through the design of an appropriate animal model. Using an *in utero Srpx2* silencing approach, we show that SRPX2 influences neuronal migration in the developing rat cerebral cortex. Wild-type, but not the mutant human SRPX2 proteins, rescued the neuronal migration phenotype caused by *Srpx2* silencing *in utero*, and increased alpha-tubulin acetylation. Following *in utero Srpx2* silencing, spontaneous epileptiform activity was recorded post-natally. The neuronal migration defects

Received September 4, 2012. Revised April 18, 2013. Accepted April 20, 2013. Advance Access publication July 5, 2013
© The Author (2013). Published by Oxford University Press on behalf of the Guarantors of Brain. All rights reserved.
For Permissions, please email: journals.permissions@oup.com

Downloaded from http://brain.oxfordjournals.org/ by guest on November 8, 2015

and the post-natal epileptic consequences were prevented early in embryos by maternal administration of tubulin deacetylase inhibitor tubacin. Hence epileptiform manifestations of developmental origin could be prevented *in utero*, using a transient and drug-based therapeutic protocol.

Keywords: developmental epilepsy; Srpx2; neuronal migration; tubulin acetylation; *in utero* prevention

Introduction

Developmental malformations of the cerebral cortex with often intractable focal epileptic seizures represent a major medical and scientific issue (Guerrini *et al.*, 2008; Barkovich *et al.*, 2012). Early developmental cortical alterations may also participate in common pathologies with little or no structural neuroimaging anomaly, including autism, dyslexia, speech impairment and epilepsy; this raises important conceptual and therapeutic issues (Ben-Ari, 2008; Manent and LoTurco, 2012). Genetic studies have identified several molecular causes of abnormal cortical development (Rubenstein and Rakic, 1999; Guerrini *et al.*, 2008). In particular, tubulins, microtubule-regulating proteins and alpha-tubulin acetylation modifiers play a crucial role in various cortical disorders (Keays *et al.*, 2007; Creppe *et al.*, 2009; de Nijs *et al.*, 2009; Heng *et al.*, 2009; Jaglin and Chelly, 2009; Jaglin *et al.*, 2009; Kumar *et al.*, 2010; Valiente and Marin, 2010; Wynshaw-Boris *et al.*, 2010; Manzini and Walsh, 2011), including polymicrogyria, which is characterized by an excess of small gyri (Jansen and Andermann, 2005). Bilateral perisylvian polymicrogyria is a developmental malformation of the speech cortex. It is at the severe end of a continuum of epileptic syndromes where subtle and transient to severe and permanent speech and language impairments occur (Rudolf *et al.*, 2009). At the benign end, Rolandic (Sylvian) epilepsy is the most common epilepsy syndrome in childhood. We had previously reported on two inherited missense mutations in the *SRPX2* (sushi-repeat containing protein, X-linked 2) gene in two families with Rolandic epilepsy, with verbal dyspraxia (p.N327S mutation) or with bilateral perisylvian polymicrogyria (p.Y72S mutation), respectively (Roll *et al.*, 2006). SRPX2 is a secreted protein expressed in the Rolandic area (Roll *et al.*, 2006). Importantly, the direct causal role of p.N327S has been recently challenged by the co-inheritance, in most patients of the corresponding family, of another missense mutation in the glutamate receptor subunit gene *GRIN2A* (Lesca *et al.*, in revision), raising an important issue about the respective participation and the interaction of those *SRPX2* and *GRIN2A* mutations in the variable epileptic, speech and cognitive components of the phenotype.

SRPX2 might strongly interfere with the development and with the functioning of the cerebral cortex. Generally, proteins with sushi domains, such as SEZ6, GABA(B1a) receptor subunit, or LEV-9, can have important (patho)physiological roles in the CNS (Gunnersen *et al.*, 2007; Gendrel *et al.*, 2009, Biermann *et al.*, 2010). Although the first molecular networks linked to SRPX2 have been identified recently (Royer-Zemmour *et al.*, 2008; Roll *et al.*, 2010; Bruneau and Szepetowski, 2011), there is a crucial need to decipher the precise developmental role of this protein and to have a better knowledge of the possible pathological mechanisms related with its mutations, in particular p.N327S. The use of rodent models, including *in utero* RNA silencing approaches, has been shown to be very efficient in deciphering major aspects of brain cortex development, and in understanding the pathophysiology of various brain disorders (Bai *et al.*, 2003; Paracchini *et al.*, 2006; Ramos *et al.*, 2006; de Nijs *et al.*, 2009; Rubenstein, 2011). In this study, we used an *in utero* RNA interference approach (Bai *et al.*, 2003) to demonstrate that SRXP2 influences neuronal migration in the developing rat cerebral cortex. Analysis of the human wild-type and mutant SRPX2 proteins indicated that an impairment of neuronal migration and of alpha-tubulin acetylation might participate in disorders of the speech cortex in human. Maternal administration of the tubulin deacetylase inhibitor tubacin prevented the abnormal neuronal migratory phenotype and the post-natal neuronal epileptiform activity caused by *Srpx2* silencing *in utero*.

Materials and methods

Constructs

Full-length wild-type and mutant human *SRPX2* coding sequences were generated from previous constructs (Roll *et al.*, 2006) using the hsSRPX2-F/hsSRPX2-R PCR primers (Supplementary Table 2). The full-length coding sequence of rat *Srpx2* was amplified by reverse transcription PCR (rnSrpx2-F/rnSrpx2-R primers) (Supplementary Table 2) from adult rat brain total RNA. PCR fragments were inserted into pCAG-IRES-GFP (pCAGIG). For short hairpin *Srpx2* silencing constructs, target sequences were selected in the rat *Srpx2* gene (Genbank NM_001108243) (Supplementary Fig. 2). Triple-point-mutated short hairpin RNA (m3shSrpx2) counterparts were used as respective controls. All oligonucleotide-based inserts were subcloned into mU6pro (Yu *et al.*, 2002). Commercially available sh-PLAUR silencing and corresponding control constructs were purchased (Qiagen). The Mec-17 overexpression construct (Li *et al.*, 2012) has been reported previously. All constructs were verified by Sanger sequencing (GATC Biotech). All animal experimentations were conducted with respect to the European Communities Council Directives, and with licences from the French Department of Agriculture and the local Veterinary Authorities.

Quantitative reverse transcription polymerase chain reaction

Quantitative reverse transcription PCR was carried out with the appropriate primers (Supplementary Table 2) in rat C6 cells transfected with pmaxGFP and with either short hairpin *Srpx2* construct (5′shSrpx2 or 3′shSrpx2) or triple-point-mutated short hairpin RNA (5′m3shSrpx2 or

Downloaded from http://brain.oxfordjournals.org/ by guest on November 8, 2015

3′m3shSrpx2) or non-recombinant vector (mU6pro), and analysed as described in Supplementary Fig. 2B and C.

Patients and Sanger sequencing

Thirty-six unrelated sporadic cases with various related disorders of the Rolandic epilepsy spectrum (atypical Rolandic epilepsy, Rolandic epilepsy with verbal dyspraxia, perisylvian polymicrogyria) were collected. Genomic DNAs were extracted from venous blood samples using a BACC3 kit (GE Healthcare). All experiments were conducted in accordance with the Declaration of Helsinki and all procedures were carried out with the adequate understanding and written informed consent that were obtained from the parents for their children and for themselves, according to the appropriate bioethics law and ethical committees (n° 05/78, CPP Strasbourg Alsace 1). The 10 coding exons and the intronic margins of *ELP4* transcripts (Genbank accession number NM_019040) were amplified by PCR and sequenced (GATC Biotech). Sequences were analysed using the Genalys 3.0 software. Primer sequences and reaction conditions are available upon request.

In utero electroporation

In utero injections and electroporations were performed as previously described (Carabalona *et al.*, 2012) in embryos from timed pregnant rats (embryonic Day 15) that were anaesthetized with ketamine (100 mg/kg)/xylazine (10 mg/kg). Wistar rats (Janvier) were raised and mated at INMED Post Genomic Platform (PPGI) animal facility. For silencing and overexpression experiments, the appropriate constructs were co-electroporated with pCAGGS-mRFP (red fluorescent protein) at a ratio 3:1 (1.5 μg/0.5 μg). For rescue experiments, the silencing construct was co-electroporated together with the appropriate expression construct and the RFP expression vector (3:3:1 ratio). pCX-EGFP-N1 was used for electrophysiological analyses and for experiments on organotypic slices.

In situ hybridization

In situ hybridization was performed on cryosections of embryonic and post-natal rat brain tissues as previously reported (Pereira *et al.*, 2008) and as further described (Supplementary Fig. 1).

Cell cultures, proteins and immunocytochemistry

Cell lines were grown and transfected according to standard procedures (Supplementary Figs 2, 6 and 7). Stably transfected Chinese hamster ovary (CHO) and U87MG cell lines were established and maintained as reported (Bruneau *et al.*, 1997) (Fig. 4 and Supplementary Fig. 6). Protein production and secretion were obtained and estimated as described in Supplementary Fig. 6. Primary neuronal cells were prepared as reported (Roll *et al.*, 2006) from cortices of 16-day-old rat embryos (E16) electroporated at embryonic Day 15 with the appropriate constructs (Supplementary Fig. 3). The tubulin acetylation analyses were performed with the appropriate primary antibodies (Supplementary Table 3), by western blotting (anti-mouse or anti-rabbit PA-conjugated secondary antibodies) after cell lysate protein extraction, and by immunocytochemistry (secondary antibodies conjugated to Alexa Fluor® 488, 555 and 647). Expression levels were estimated by western blot scanning with Epson Perfection 3200 Photo scanner or with the Genesys software of the G:BOX gel imaging system (Syngene). Immunocytochemistry images were captured with a fluorescence microscope (Zeiss Axio Imager Z2) with ApoTome attachment.

Morphological analyses and immunohistochemistry

Morphological and immunohistochemistry experiments were carried out as described previously (Royer-Zemmour *et al.*, 2008) on coronal slices (100 μm, vibratome, Microm; 14–20 μm, cryostat, Leica) with the appropriate primary (Supplementary Table 3) and secondary (Alexa Fluor® 488, 555 or 647-conjugated anti-rabbit, anti-mouse, anti-rat, anti-goat or anti-guinea pig IgGs) antibodies. Hoescht 33258 (1:2000, Sigma) was used for nuclei staining. BrdU (50 μg/g of body weight; Sigma) was injected intraperitoneally to the pregnant mother. Terminal deoxynucleotidyl transferase dUTP nick end labeling (TUNEL) assays were performed as recommended (Promega). Images were acquired by using a Zeiss Axio Imager Z2 microscope with structured illumination (ApoTome) equipped with Zeiss AxioCam MRm camera and processed using Axiovision software or with confocal laser microscope (Leica TCS SP2) equipped with a CoolSNAP camera.

Time-lapse experiments

Organotypic slices of embryonic Day 17 rat forebrains were prepared and cultured for 1 day in Neurobasal® medium (Life Technologies), starting with brains electroporated 48 h before (embryonic Day 15) in control (GFP) or silencing (GFP + 5′shSrpx2) conditions, as described (Heng *et al.*, 2008; Sessa *et al.*, 2010). For time-lapse experiments, the dishes were mounted in a CO_2 incubator chamber (5% CO_2, 37°C) fitted onto an inverted confocal microscope (LSM510, Zeiss). Repetitive acquisitions were performed every 15 min for up to 6–7 h in latero-dorsal regions of the cortex where ~30–40 successive 'z' optical planes spanning 60–80 μM were acquired. *z*-stacks were combined in ImageJ. Average velocity of migrating cells was obtained using the ImageJ plugin Manual tracking (F. Cordelières, Institut Curie, France).

Pentylenetetrazol-induced seizures

Pentylenetetrazol (PTZ) experiments were performed and analysed as described previously (Velisek *et al.*, 1992). GABAergic antagonist pentylenetetrazol was dissolved in 0.9% NaCl buffer and administered to post-natal Day 14 rats through two intraperitoneal injections (25 mg/kg of body weight) with a 10 min interval between each. Rats were then immediately observed and video-monitored for 30 min. The occurrence of generalized tonic-clonic seizures, corresponding to the more severe score (Class 5) according to a previously defined scale (Velisek *et al.*, 1992), was observed (Supplementary Videos 3 and 4).

Electrophysiological recordings from brain slices

Multisite extracellular recordings of spontaneous activity were performed using multi-electrode arrays made up of 60 planar microelectrodes (TiN/SiN, 30 μm electrode diameter, 200 μm pitch) arranged over an 8 × 8 square grid (Multi Channel Systems). After ×1200 amplification (Multi Channel Systems MEA 1060), signals were sampled at 10 kHz using the Multi Channel Systems data acquisition card controlled by the Multi Channel Systems MCRack software for data monitoring, acquisition and storage. After recording, the raw

Downloaded from http://brain.oxfordjournals.org/ by guest on November 8, 2015

signals obtained from each experiment were processed off-line by using custom software tools specifically developed in MATLAB (The Mathworks). Recordings were performed at 30–32°C. Slices were maintained in dishes and perfused with oxygenated artificial CSF of the following composition (in mM): 126 NaCl, 3.5 KCl, 1 $MgCl_2$, 2 $CaCl_2$, 10 D(+)-glucose, 1.20 NaH_2PO_4, 26 $NaHCO_3$ (5% CO_2 / 95% O_2). The spontaneous activity was monitored and recorded for 30–120 min, starting 15–20 min after setting the slice in the recording chamber to let the slice adapt to the new environment and reach a stable level of activity.

For patch clamp recordings, standard whole-cell recordings were performed in coronal neocortical rat brain slices at room temperature (20–22°C) from the soma of GFP labelled and non-labelled neurons using an EPC-9 (HEKA Elektronik) amplifier and filtered at 3–10 kHz. Slices in the recording chamber were perfused with oxygenated artificial CSF of the following composition (in mM) : 126 NaCl, 3.5 KCl, 1 $MgCl_2$, 2 $CaCl_2$, 10 D(+)-glucose, 1.20 NaH_2PO_4, 26 $NaHCO_3$ (5% CO_2 / 95% O_2). The intracellular solution contained (in mM): 130 K-gluconate, 10 Na-gluconate, 4 NaCl, 4 MgATP, 4 phosphocreatine, 10 HEPES, and 0.3 GTP (pH 7.3 with KOH). Biocytin (final concentration 0.3–0.5%) was added to the pipette solution to label the neurons from which recordings were obtained. Neurons were visualized by using infrared differential interference contrast and fluorescent video microscopy. Spontaneous postsynaptic currents were recorded for 15 min at the reversal potentials for GABAergic (0 mV) and glutamatergic (−70 mV) currents. All recordings were made in normal artificial CSF (1 mM Mg^{2+}) without any pro-epileptic pharmacological drug. Stored data were analysed using the Mini Analysis 6.0.3 (Synaptosoft Inc) and Origin (MicroCal) software. To minimize potential sampling bias, the pups from at least three deliveries for each condition were studied.

Ex vivo and *in vivo* experiments with tubacin

Ex vivo rescue experiments were adapted from previously published *in vitro* studies (Sudo and Baas, 2010), with slight modifications. Briefly, tubacin (ChemieTek) or niltubacin (Enzo Life Sciences) (2.5 μM each) was added to the Neurobasal® medium of organotypic slices taken from *Srpx2*-silenced embryos 1 day after embryonic Day 15 electroporation. Slices cultured for 2 days were fixed after 24 h of tubacin treatment and images were acquired (confocal microscopy, LSM510, Zeiss). For the *in vivo* experiments, intraperitoneal administrations 24 and 48 h after *in utero* electroporations of tubacin or of the vehicle (dimethyl sulphoxide, DMSO) to the pregnant rats were performed according to the aforementioned *ex vivo* rescue experiments, and to previously reported *in vivo* procedures (d'Ydewalle *et al.*, 2011) (detailed protocol available upon request). To control the delivery into embryonic brains after maternal intraperitoneal injections, brain extraction of tubacin was carried out using a procedure adapted from similar extraction methods (Zhou and Gallo, 2010). The presence or absence of tubacin fragment ions into the brain extracts after discontinuation of maternal treatment with tubacin or with DMSO (the vehicle), respectively, was detected by multiple reaction monitoring mass spectrometry on a Fast LC-MS/MS platform combining UHPLC Nexera and the tandem MS model (LC-MS triple quadripole 8030), as recommended (Shimadzu) (Supplementary Fig. 10).

Quantifications

For cell counting analyses, at least three adjacent brain sections were analysed from each sample by ApoTome or confocal microscopy and ×5 to ×40 magnified fields were acquired. The distribution of cells was quantified as described (Elias *et al.*, 2007) (Fig. 2B). Fluorescent neurons were counted by a specific plugin of ImageJ (F. Cordelières, Institut Curie, France). For all experiments, 500 to 3000 cells were counted in each brain. The *in vivo* orientation of radially migrating neurons was performed with ImageJ in 159–161 individual cells randomly chosen in three brains for each experimental condition. Morphometrical analyses and reconstruction of neurons were performed using the ImageJ plugin NeuronJ. To evaluate *ex vivo* rescue efficiencies, fluorescence intensities were quantified in each organotypic slice from the corresponding *z*-stack after automated subdivision into five equal regions from ventricle to the pial surface, by a specific ImageJ plugin (Fig. 5B).

Statistics

An overview on all statistical data is given in Supplementary Table 1. Data were expressed as means ± SEM unless otherwise stated. Briefly, non-parametric Kruskall-Wallis testing was used to detect heterogeneous distribution between groups wherever appropriate (cell counting analyses, quantitative reverse transcription PCR experiments, western blot analyses, neuronal migration speed rates, morphometric dendritic values, burst parameters), and was followed either by non-parametric Mann-Whitney test (two-tailed) with the appropriate adjustment for multiple comparisons whenever needed (Bonferroni), or by Dunn's post test for multiple comparisons. Mann-Whitney test, two-tailed, was also used in the analysis of quantitative reverse transcription experiments, cell proliferation parameters, neuronal speed rates, and rescue experiments in organotypic slices. The parametric unpaired *t*-test (two-tailed) was used for the validation of *Srpx2* silencing in neuronal cell cultures, after the normal distribution of the data ($n > 30$ in each cell category) was verified. Fisher's exact test (two-tailed), with Bonferroni correction whenever needed, was used in pentylenetetrazol-induced seizures experiments, in the estimation of embryonic rescue after tubacin treatment, in the analysis of apical dendrite orientations, in the analysis of bursting cell numbers, and in the mass spectrometry detection of tubacin in embryonic brain extracts after maternal treatments.

Results

In utero rat *Srpx2* silencing leads to altered position of projection neurons in the developing cerebral cortex

In agreement with previous reverse transcription PCR experiments (Royer-Zemmour *et al.*, 2008), expression of the rat *Srpx2* gene was revealed by *in situ* hybridization in the developing telencephalon and in the post-natal brain (Supplementary Fig. 1A–C). Rat SRPX2 protein was also detected in the same stages by immunoblotting and by immunohistochemistry (Fig. 1A and B). SRPX2 showed expression at various embryonic stages from the proliferative ventricular/subventricular zones to the cortical plate and was notably detected in neural and neuronal progenitor cells (Fig. 1C–F and Supplementary Fig. 1D). SRPX2 expression was also shown at embryonic Day 20 (E20) in neuronal cells (Fig. 1F and G), notably along radial glial processes (Fig. 1H).

Downloaded from http://brain.oxfordjournals.org/ by guest on November 8, 2015

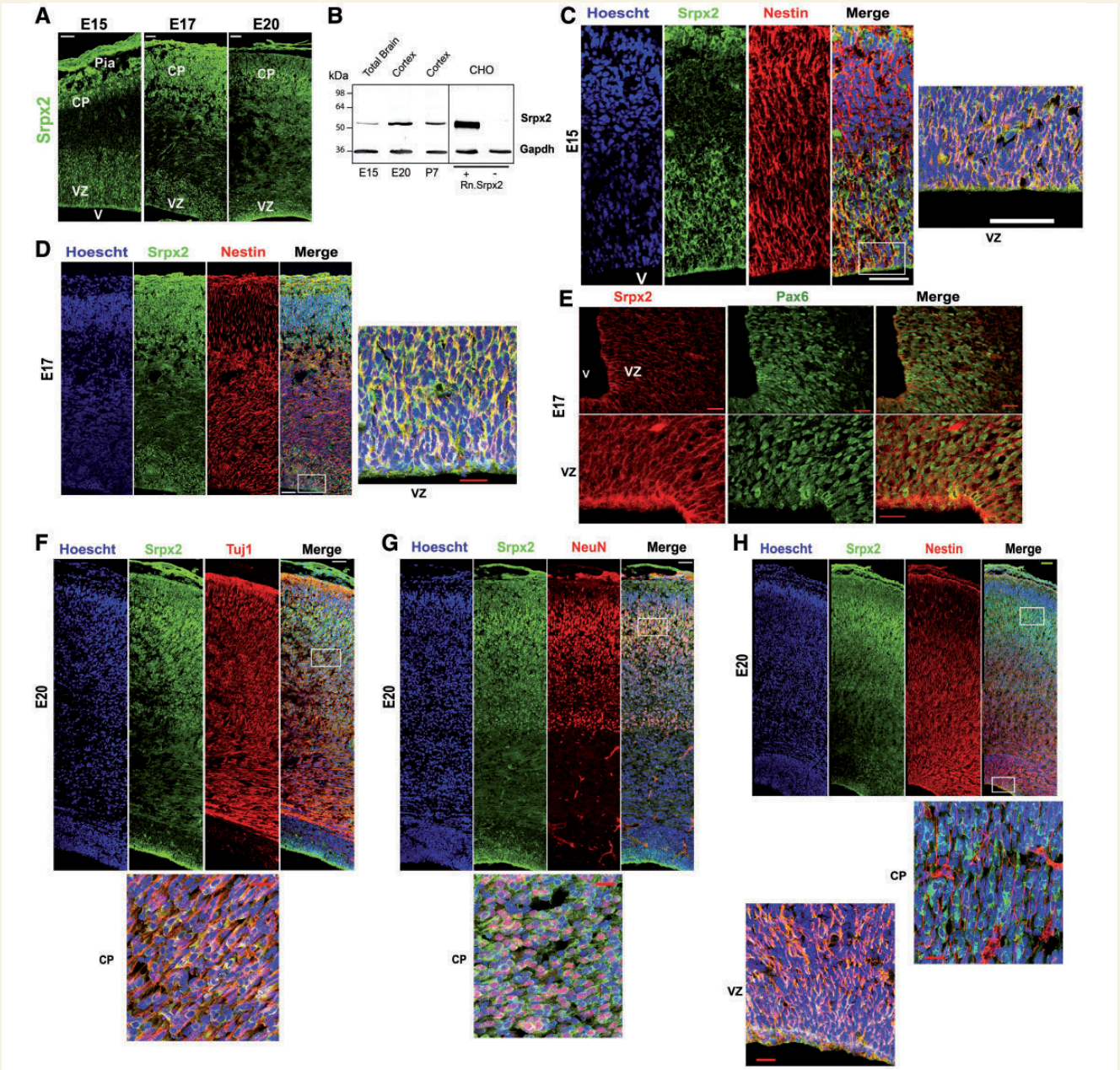


Figure 1 Srpx2 is expressed in the developing cerebral cortex. (**A**) Srpx2 protein distribution was determined by immunohistochemistry in coronal sections of the telencephalon at various developmental stages (E15, E17, E20). Fluorescence microscopy with ApoTome attachment. (**B**) Rat Srpx2 (Rn.Srpx2) was detected by western blot analyses at embryonic Day 15 (E15), E20 and post-natal Day (P7). CHO = Chinese hamster ovary cells transfected (Rn.Srpx2+) or not (−) with recombinant plasmid pCAGIG for the expression of Rn.Srpx2 and of GFP. Rn = *Rattus norvegicus*. (**C** and **D**) Rat Srpx2 is expressed in nestin-positive radial glial cells at embryonic Day 15 (E15, **C**) and E17 (**D**). Hoescht = blue staining. Fluorescence microscopy with ApoTome attachment or (close-up picture) confocal microscopy. (**E**) Srpx2 protein was detected by immunohistochemistry in coronal sections of the telencephalon at embryonic Day 17 (E17), in Pax6-positive neural progenitor cells. Co-immunolabelling of rabbit anti-SRPX2 and anti-Pax6 antibodies was done with the LinBlock reagent (Linaris). *Bottom*: Close-up image of Pax6-positive, Srpx2-positive neural progenitor cells. Fluorescence microscopy with ApoTome attachment. (**F–H**) Rat Srpx2 is expressed at embryonic Day 20 (E20) in immature, Tuj1-positive (**F**) and mature, NeuN-positive (**G**) neuronal cells, and along Nestin-positive, radial glial processes (**H**). Fluorescence microscopy with ApoTome attachment or (close-up images) confocal microscopy. V = ventricle; VZ = ventricular zone; CP = cortical plate. Scale bars: red = 20 μm; white = 50 μm; green = 100 μm.

Cortical projection neurons are generated from the dorsal telencephalon in the ventricular/subventricular zones and migrate radially towards the pial surface through the intermediate zone to reach the cortical plate; the future neocortex. In order to investigate the role of *Srpx2* in the development of the cerebral cortex, embryonic Day 15 rat embryos were electroporated *in utero* with control or with two specific short hairpin RNA constructs targeting the 5′ (5′shSrpx2) and the 3′ (3′shSrpx2)

Downloaded from http://brain.oxfordjournals.org/ by guest on November 8, 2015

untranslated regions of *Srpx2*, respectively (Supplementary Figs 2 and 3). *Srpx2* silencing caused impaired positioning of electroporated projection neurons at embryonic Day 20 in the somatosensory cortex (Fig. 2 and Supplementary Fig. 4). The phenotypes of *Srpx2* silencing were significantly different from the regular positioning of projection neurons obtained in control conditions (Fig. 2A and B and Supplementary Table 1). As the specific short hairpin RNAs yielded identical phenotypes, one of the two (5′shSrpx2) was used for all next experiments. At embryonic Day 20 ectopic *Srpx2*-silenced cells showed expression of molecular markers of either immature (Tuj1) or mature (NeuN) neurons (Fig. 2C and D). The phenotype caused by *Srpx2* silencing persisted after birth (Fig. 2E). Specificity of silencing was confirmed by successful rescue electroporation experiments with expression of exogenous rat Srpx2 protein (Fig. 2A and B).

The phenotype caused by *in utero Srpx2* silencing might be due to any perturbation in one of the complex sequential processes that are necessary for the cerebral cortex to develop properly, such as cell proliferation and cycle exit or cell migration (Marin and Rubenstein, 2003; Kriegstein, 2005). Consistent with the absence of any effect of SRPX2 on cell proliferation previously reported (Tanaka *et al.*, 2009), examination of cell cycle markers BrdU (bromodeoxyuridine), Ki-67 and pHH-3 (phosphohistone H3) did not reveal any significant anomaly in *Srpx2*-silenced neural cell progenitors (Supplementary Fig. 5A–C). TUNEL assay and cleaved caspase 3 labelling did not reveal any influence on apoptosis (data not shown). No modification in the structure of the radial glia scaffold that drives the migration of projection neurons was observed (Supplementary Fig. 5D and E). Of note, various interneuron labellings did not show any obvious indirect effect on the trapping of interneurons in the ectopic area (data not shown). Although more subtle alterations in either of those mechanisms cannot be excluded, a direct role for SRPX2 in radial neuronal migration was privileged.

Srpx2 silencing impairs neuronal migration

Together with the role of SRPX2 in non-neuronal cell migration previously reported (Miljkovic-Licina *et al.*, 2009; Tanaka *et al.*, 2009), this prompted us to investigate further the migration of postmitotic neurons *ex vivo*. Time-lapse imaging of cortical slices taken from rat embryos 2 days after 5′shSrpx2 electroporation at embryonic Day 15, confirmed the impaired migration of silenced neurons (Fig. 3A and Supplementary Videos 1 and 2). Morphological abnormalities consistent with a polarity defect were seen in *Srpx2*-silenced neurons. A subset of the cells did not extend a leading process appropriately, remained multipolar and were unable to migrate radially. Cells that were still able to adopt a bipolar morphology and to migrate towards the cortical plate, showed significantly reduced speed rates (7.42 ± 0.81 μm/h, $n = 25$ cells) as compared with control electroporated neurons (12.93 ± 1.26 μm/h, $n = 25$ cells) ($P = 0.0002$, Mann Whitney test, two-tailed), which, in turn, reached the previously reported speed rates of control bipolar neurons (13.7 ± 1.9 μm/h) (Creppe *et al.*, 2009). At post-natal Day 7, altered orientation of the apical dendrite was observed (Fig. 3B). Also, reduced dendritic length and reduced number of dendritic branches were seen in *Srpx2*-silenced cortical neurons at post-natal Day 14 (see below).

SRPX2 influences alpha-tubulin acetylation

The morphological abnormalities and the neuronal migratory phenotype caused by *Srpx2* silencing *in utero* were consistent with cytoskeletal defects. In particular, multiple neuronal migration pathways converge on alpha-tubulins (Kumar *et al.*, 2010). The possible influence of SRPX2 on the acetylation of tubulin alpha was then tested *in vitro*. When CHO cells were cultured in a medium containing rat Srpx2 protein, a significant increase in the relative amount of acetylated alpha-tubulin was obtained as compared to the control condition without Srpx2 (Fig. 4A and B; Supplementary Fig. 6). Rat Srpx2 also led to increased acetylation of alpha-tubulin in other cell lines (Supplementary Fig. 7A). Similar results were obtained in the presence of the human SRPX2 protein (Fig. 4A–C; Supplementary Figs 6 and 7A). Notably, such an effect was not seen on the acetylation of the actin-interacting protein cortactin (Supplementary Fig. 7B), and SRPX2 did not lead to quantitative changes in the expression of either of the HDAC6 and SIRT2 deacetylases, or of the MEC17 (now known as ATAT1) and ELP3 acetyltransferases (Supplementary Fig. 7B). *Srpx2* silencing *in vitro* led to cell-autonomous decreased expression of acetylated alpha-tubulin in AR4-2J cells (Supplementary Fig. 7C), and 5′shSrpx2 electroporation *in utero* also decreased the alpha-tubulin acetylation levels of the corresponding *Srpx2*-silenced brain areas (Fig. 4D) and of the derived primary neuronal cells (Supplementary Fig. 7D). We then asked whether the effects of SRPX2 could be influenced by its known receptor uPAR (plasminogen activator receptor, urokinase type) (Royer-Zemmour *et al.*, 2008), which we detected in Srpx2-positive cells in the developing cortex (Supplementary Fig. 8A), and in primary neuronal cells derived from neural progenitors that had been electroporated *in utero* (Supplementary Fig. 8B). On the one hand, HEK293 cells do not express the SRPX2 receptor uPAR, as previously reported (D′Mello *et al.*, 2009) and also verified here (data not shown); this indicated that SRPX2-driven tubulin-acetylation was not dependent on uPAR in these cells. Also, exogeneous expression of uPAR at the cell surface of CHO cells did not significantly influence the increase in tubulin acetylation caused by SRPX2 (data not shown). On the other hand, silencing the endogeneous uPAR-encoding *PLAUR* gene in stably-transfected U87MG cells led to a significant inhibition of the tubulin-acetylation effects of SRPX2 (Fig. 4E). Hence the signalling events linking SRPX2 to tubulin acetylation may involve either uPAR or other as-yet undetermined SRPX2 receptors in different cell types.

In contrast with their wild-type counterpart, no or only slight increase in alpha-tubulin acetylation was obtained with either of the two mutant SRPX2 proteins (Fig. 4A–C; Supplementary Fig. 6). The possible existence of a link between those mutations on the one hand, and the impaired radial neuronal migration on the other hand, was then further explored *in vivo*. Expression and rescue experiments were performed with the wild-type and

Downloaded from http://brain.oxfordjournals.org/ by guest on November 8, 2015

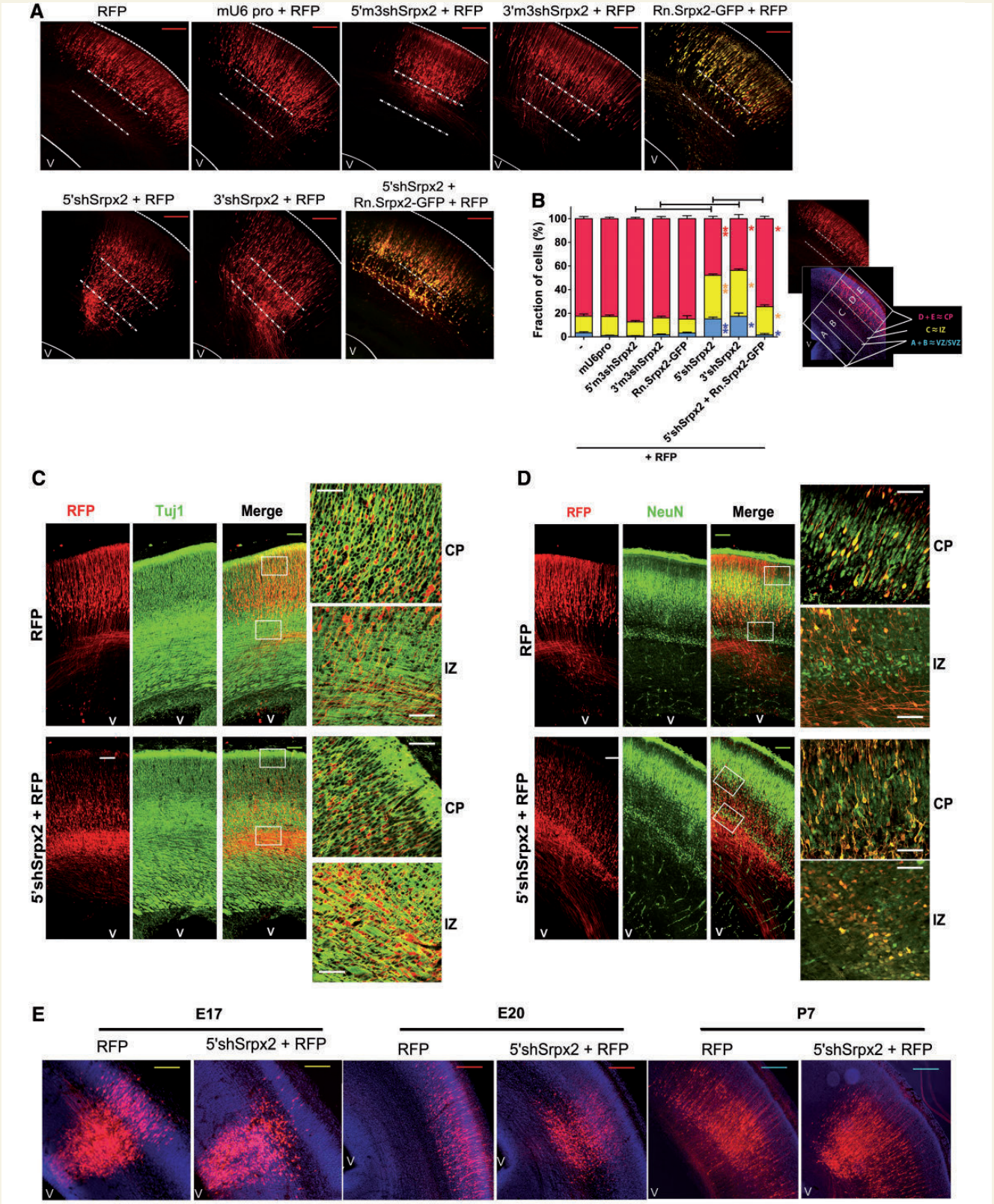


Figure 2 *In utero Srpx2* silencing leads to altered positioning of projection neurons in the developing rat brain cortex. (**A**) Distribution of red fluorescent protein-positive cells in rat brain cortices (coronal sections) at embryonic Day 20 (E20), 5 days after electroporation of: pCAGGS-mRFP (RFP, red fluorescent protein) alone or with either of mU6pro control plasmid or specific (5′shSrpx2, 3′shSrpx2) or mutant ineffective (5′m3shSrpx2, 3′m3shSrpx2) *Srpx2* short hairpin RNA constructs, and of: pCAGGS-mRFP with rat Rn.Srpx2-GFP expression construct either alone or with 5′shSrpx2 construct. Subregions were defined as in (**B**). (**B**) Significant changes in the distribution of cells at

(continued)

Downloaded from http://brain.oxfordjournals.org/ by guest on November 8, 2015

mutant human SRPX2 constructs. Expression of mutant p.Y72S-SRPX2 had no effect on its own on the regular positioning of projection neurons at embryonic Day 20 (Supplementary Fig. 9A). Co-electroporation with 5′shSrpx2 showed that, in contrast with wild-type human SRPX2, p.Y72S-SRPX2 had lost the ability to rescue the phenotype caused by *Srpx2* silencing (Supplementary Fig. 9B). Altogether this indicated a loss-of-function mechanism. The other SRPX2 mutation was then tested. Single electroporation of p.N327S-SRPX2 construct caused by itself an altered and persistent pattern of neuronal positioning that was significantly attenuated by competitive overexpression of wild-type SRPX2 (Supplementary Fig. 9A–C), arguing for a dominant-negative effect, as predicted (Roll *et al.*, 2006).

Administration of tubacin during pregnancy prevents the post-natal epileptiform activity caused by *Srpx2* silencing *in utero*

Consistent with the influence of SRPX2 on alpha-tubulin acetylation, the phenotype caused by *Srpx2* silencing was significantly rescued *in vivo* with vector-based overexpression of Mec-17 alpha-tubulin acetyltransferase (Akella *et al.*, 2010; Li *et al.*, 2012) (Fig. 5A). The impaired neuronal migration was also significantly rescued *ex vivo* when organotypic slices taken from *Srpx2*-silenced embryos were cultured in the presence of tubacin, a specific inhibitor of the alpha-tubulin deacetylating enzyme HDAC6 (Haggarty *et al.*, 2003) (Fig. 5B). Niltubacin, the inactive homologue of tubacin, had no effect.

The possibility that pharmacological targeting of tubulin acetylation may also prevent *in vivo* the developmental phenotype caused by *in utero Srpx2* silencing was then questioned. Beforehand, the ability to deliver tubacin into the brains of naive embryos after short intraperitoneal administration to their mother during pregnancy, was demonstrated by multiple reaction monitoring mass spectrometry after tubacin extraction (Supplementary Fig. 10A–C). Increased alpha-tubulin acetylation could be detected in most but not all tubacin-treated embryonic brains (Supplementary Fig. 10D); this was not unexpected, given the inherently variable and transient biochemical consequences of the therapeutic protocol used here. Tubacin was then injected at embryonic Days 16 and 17 to three pregnant rats having been electroporated on embryonic Day 15, *Srpx2*-silenced embryos ($n = 19$). The injections dramatically improved the neuronal migratory phenotype at embryonic Day 20 (Fig. 5C; Supplementary Table 1). Indeed, 15 of 19 *Srpx2*-silenced embryos treated with tubacin were fully or partially rescued, whereas the vehicle (dimethyl sulphoxide, DMSO) had no improving effect (0/12 embryos from three pregnant rats) ($P = 0.000016$, Fisher's exact test, two-tailed) (Fig. 5D). Consistently, there were significantly less ectopic *Srpx2*-silenced neurons in post-natal Day 14 rats electroporated with 5′shSrpx2 and treated with tubacin *in utero*, as compared with the untreated silencing condition (Fig. 6A). The aforementioned morphological abnormalities seen in *Srpx2*-silenced cortical neurons at post-natal Day 14 were also significantly improved (Fig. 6B and C). Of note, no side-effect on the proliferation (data not shown) or on the post-natal positioning of other late-migrating neurons (Supplementary Fig. 10E) was detected. Overall tubacin given during pregnancy had long-term beneficial influence on the neuronal positioning and morphology of *Srpx2*-silenced neurons in the offsprings.

Developmental malformations of the cerebral cortex are frequently associated with epileptic activity (Guerrini *et al.*, 2008; Andrade, 2009; Manent *et al.*, 2009). Furthermore, both the *SRPX2* mutations were found in the context of focal epileptic seizures in human (Roll *et al.*, 2006). Higher risk to chemically-induced seizures of post-natal Day 14 rats subjected to 5′shSrpx2 *in utero* electroporations (Supplementary Fig. 11A and B; Supplementary Videos 3 and 4), suggested abnormal functioning of the networks comprising *Srpx2*-silenced neurons. Consistently, microelectrode array extracellular recordings in acute neocortical slices taken from post-natal Day 14 *Srpx2*-silenced rats, revealed spontaneous bursts, mostly diffused over the area of the GFP (green fluorescent protein)-labelled cells in layers IV–V, in the absence of any proconvulsive agent (Supplementary Fig. 11C–E). Slices from control electroporated rats did not show such a bursting activity (Supplementary Fig. 11F). After tubacin treatment *in utero*, the *Srpx2*-silenced rat brain slices showed greatly reduced spontaneous bursting activity (Supplementary Fig. 11G).

The cellular basis of the high susceptibility to epileptiform activity caused by *Srpx2* silencing *in utero* was then studied in slices by whole-cell voltage clamp recordings of spontaneous excitatory and inhibitory currents from neurons of cortical layers IV–V, according to the microelectrode array extracellular recordings (Fig. 7A–C). In *Srpx2*-silenced cerebral cortices, there was a significant increase in

Figure 2 Continued
embryonic Day 20 (E20) was found in the two specific short hairpin *Srpx2* conditions (Kruskall-Wallis test followed by Mann Whitney test, two-tailed, with Bonferroni correction). Expression of wild-type Rn.Srpx2-GFP did not cause any phenotype and significantly rescued the cell distribution defect caused by *Srpx2* silencing. For the sake of clarity, not all comparisons are shown (Supplementary Table 1). Values represent mean ± SEM from 4–8 independent experiments. Automated subdivision into five regions of equal length, from ventricle (V) to the surface, was done as previously described (Elias *et al.*, 2007). A + B ≈ ventricular/subventricular zones (VZ/SVZ; blue), C ≈ intermediate zone (IZ; yellow), D + E ≈ cortical plate (CP; red). (**C** and **D**) Detection of ectopic neurons caused by Srpx2 silencing *in utero*. Tuj1 (**C**) and NeuN (**D**) immunolabelling of immature and mature ectopic neuronal cells, respectively, on coronal sections of embryonic Day 20 (E20) rat brains electroporated in control (RFP) and in silencing (5′shSrpx2 + RFP) conditions. IZ = intermediate zone; CP = cortical plate. Fluorescence microscopy with ApoTome attachment or (close-up image) confocal microscopy. (**E**) Altered pattern of neuronal migration caused by *Srpx2* silencing is also detected at embryonic Day 17 (E17) and after birth (post-natal Day 7, P7). Hoescht = blue staining. Scale bars: white = 50 μm; yellow and green = 100 μm; red = 200 μm; blue = 400 μm.

Downloaded from http://brain.oxfordjournals.org/ by guest on November 8, 2015

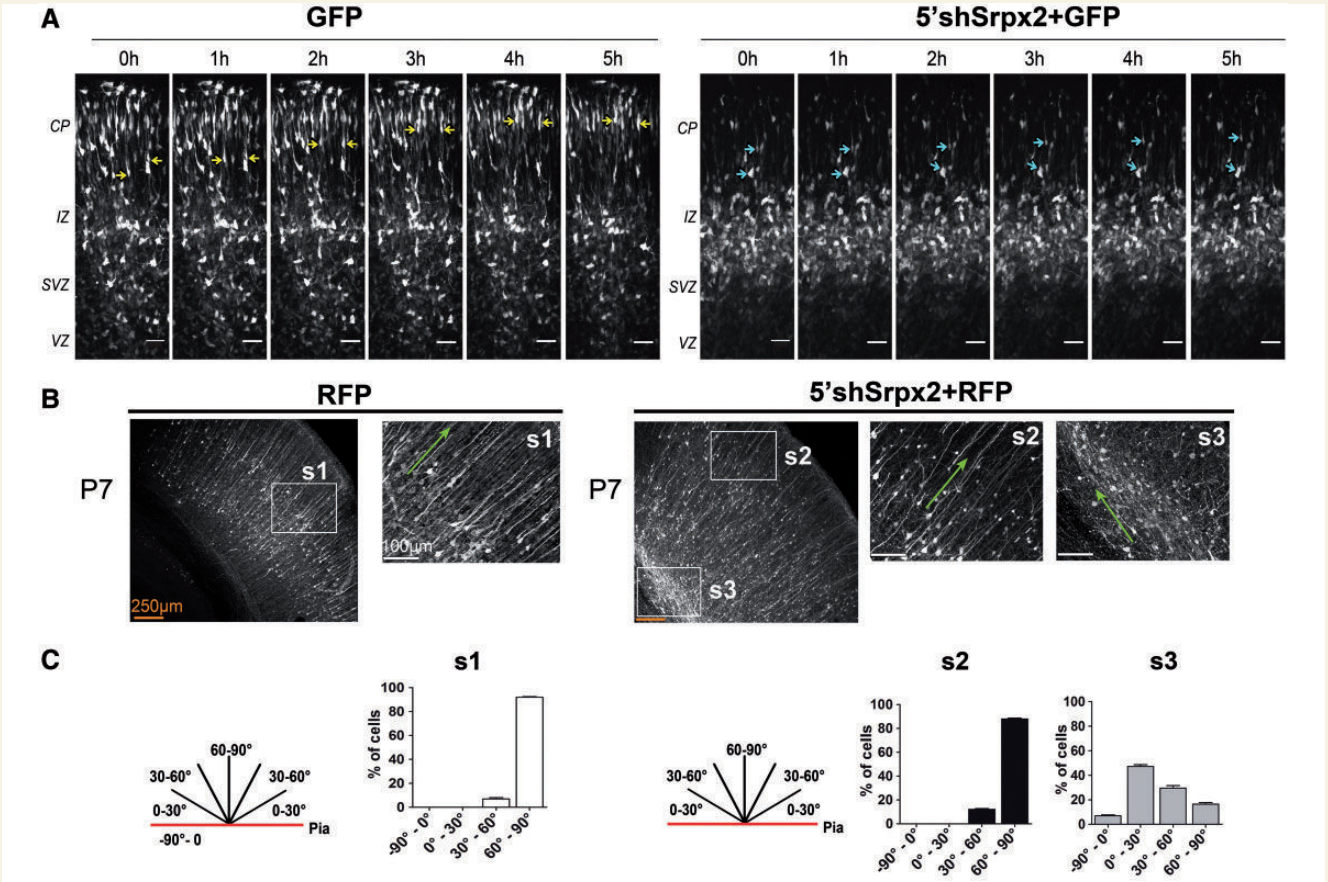


Figure 3 *Srpx2* silencing impairs neuronal migration and orientation. (**A**) Time lapse experiments demonstrate impaired radial migration of *Srpx2*-silenced neurons. Slices from embryonic Day 15 electroporated cerebral cortices were taken at embryonic Day 17 and cultured for 1 day *in vitro*. Silenced neurons (5′shSrpx2 + GFP, blue arrows) displayed absent or slow-speed migration as compared with neurons in control condition (GFP, yellow arrows). Images taken from videos (Supplementary Videos 1 and 2) of migrating neurons over 5 h of recording. Scale bar: white = 40 µm. (**B**) Misplaced *Srpx2*-silenced neurons (5′shSrpx2 + RFP, square n°3, s3) showed non-radial orientation of the apical dendrites at post-natal Day 7. RFP = control condition. (**C**) Significant difference in the distribution of apical dendrite orientations was shown in misplaced cells from 5′shSrpx2 + RFP condition (s3) as compared with cortical cells from 5′shSrpx2 + RFP condition (s2) ($P < 0.00001$) and from control condition (s1, RFP) ($P < 0.001$). No significant difference was observed between s1 and s2. Fisher's exact test, two-tailed, Bonferroni correction (Supplementary Table 1). Orientations were estimated with ImageJ in 159–161 individual cells randomly chosen in 3–7 independent experiments for each condition. IZ = intermediate zone; CP = cortical plate; SVZ = subventricular zone; VZ = ventricular zone.

the number of cells showing prominent spontaneous epileptiform activity (interictal-like bursts associated with both glutamatergic and GABAergic inputs) ($P < 0.0001$ for both, Fisher's exact test, two-tailed), as compared to the control electroporation condition (Fig. 7D). Of note, spontaneous bursting activity has already been described in control conditions in a minority of neocortical neuronal cells in similar post-natal stages (Yassin *et al.*, 2010). The *in utero* expression of the human mutant p.N327S-SRPX2 protein that caused a persistent alteration in neuronal positioning on its own (Supplementary Fig. 9A–C), was also associated post-natally with a significant increase in spontaneous bursting activity, whereas its wild-type counterpart had no significant effect (Supplementary Fig. 12A–C). Interestingly, when recordings were made simultaneously from pairs of *Srpx2*-silenced GFP-labelled neurons and their non-electroporated neighbours, synchronized bursts between the silenced and the non-silenced cells were detected. The parameters of the bursts (maximal amplitude and charge transfer) significantly increased in silencing conditions (Fig. 7A, B, E, F, H and I; Supplementary Fig. 11H and I). Importantly, glutamatergic integral burst charge densities significantly increased (Fig. 7G) whereas the increase in GABAergic integral burst charge densities did not reach statistical significance (Fig. 7J).

The neuronal electrophysiological activity of the offspring caused by *Srpx2* silencing *in utero*, showed significant improvement after prenatal administration of tubacin; indeed, the number of bursting neurons and the electrophysiological parameters of spontaneous activity were either fully (glutamatergic bursts) or partially (GABAergic bursts), similar to control values (Fig. 7C–F, H and I; Supplementary Fig. 11H and I). Also, tubacin treatment prevented the increase in excitatory glutamatergic integral burst charge densities seen in *Srpx2*-silenced condition (Fig. 7G). Therefore, maternal delivery of tubacin during pregnancy prevented the

Downloaded from http://brain.oxfordjournals.org/ by guest on November 8, 2015

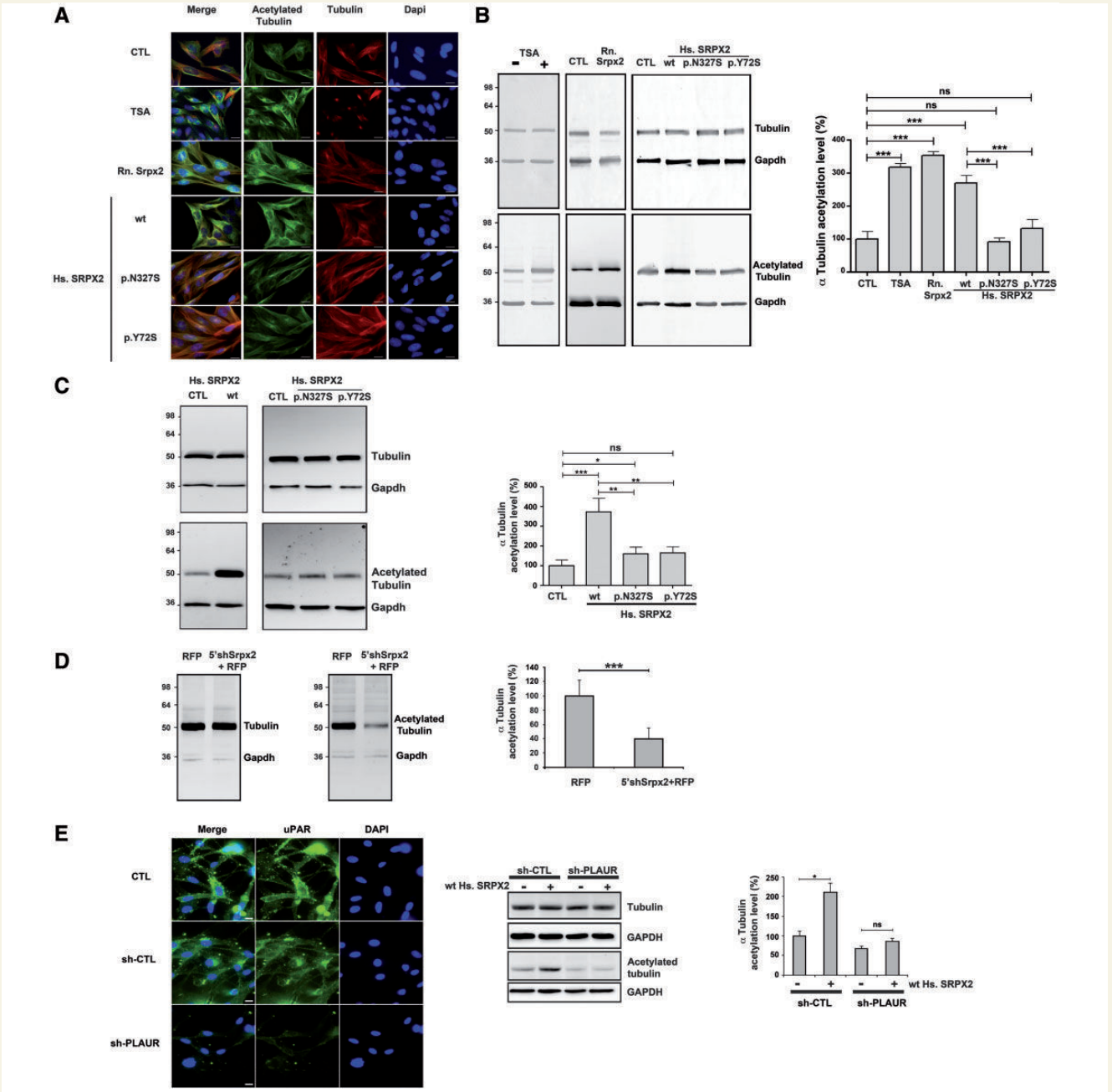


Figure 4 Wild-type, but not the mutant SRPX2 proteins, increase alpha-tubulin acetylation. (**A–C**) Acetylation status of cells cultured in conditioned medium with either rat (Rn.) Srpx2 or human (Hs.) wild-type (wt) or mutant (p.Y72S, p.N327S) SRPX2 proteins (Supplementary Fig. 6). CTL = control; TSA = trichostatin A (0.5 μM). (**A**) Immunocytochemistry experiments. TSA (positive control), Rn.Srpx2 and wild-type Hs.SRPX2 increase acetylation of alpha-tubulin (green) in CHO-K1 cells compared with total alpha-tubulin (red). The mutant proteins had no effect. (**B** and **C**) Western blot experiments. Rn.Srpx2 and wild-type Hs.SRPX2 increase the ratio of acetylated versus total alpha-tubulin levels in CHO-K1 (**B**). Similar results were obtained in U87MG cells (**C**). Mutant human proteins had little or no effect. Western blots were normalized with GADPH. Control conditions were set to 100%. Values ± SEM represent the mean of at least six independent experiments. (**D**) *Srpx2* silencing *in utero* decreases alpha-tubulin acetylation. Western blot experiments with pooled proteins extracted from punches of fluorescent areas in embryonic Day 17 *Srpx2*-silenced embryos (5′shSrpx2) and in control (RFP)-electroporated embryos (n = 4 to 6 embryos each). Control conditions were set to 100%. Histograms represent the values ± SEM of eight independent pools for each. (**E**) *PLAUR* silencing inhibits the increase in alpha-tubulin acetylation caused by SRPX2 in U87MG cells. *Left*: Expression of the uPAR protein encoded by the *PLAUR* gene, was barely detectable in U87MG cells stably transfected with sh-PLAUR silencing construct. Control silencing construct (sh-CTL) had no effect. *Right*: Wild-type Hs.SRPX2 increased the ratio of acetylated versus total alpha-tubulin levels in U87MG cells stably transfected with sh-CTL; this effect was lost in U87MG cells stably transfected with sh-PLAUR. Western blots were normalized with GAPDH. Control conditions were set to 100%. Values ± SEM represent the mean of eight independent experiments for each condition.

Downloaded from http://brain.oxfordjournals.org/ by guest on November 8, 2015

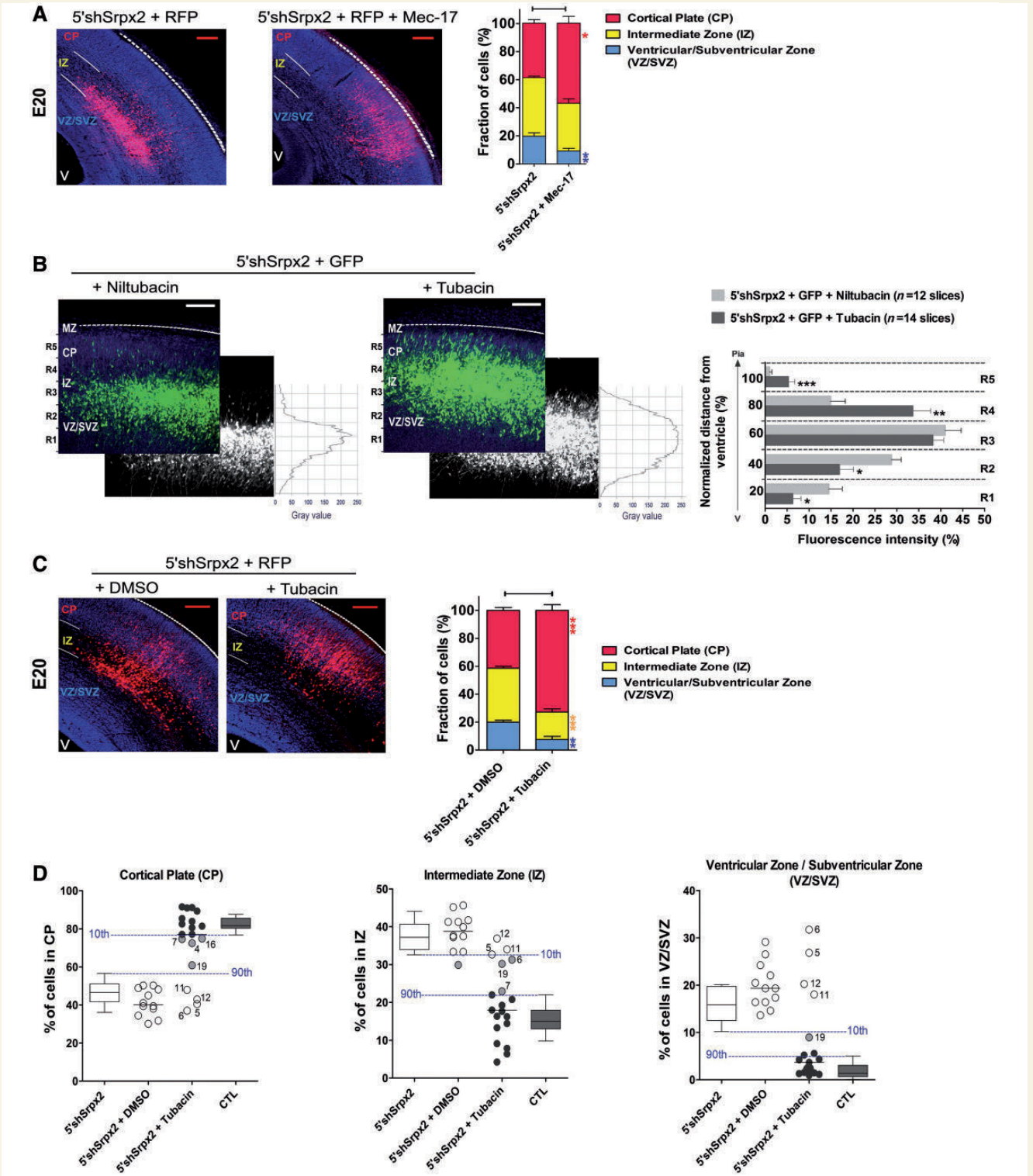


Figure 5 Rescue of the embryonic defects by tubacin administration during pregnancy. (**A**) Mec-17 acetyltransferase significantly rescued *in vivo* the altered neuronal distribution seen at embryonic Day 20 (E20) after *Srpx2* silencing *in utero*. Values represent mean ± SEM. V = ventricle. Mann-Whitney test, two-tailed. (**B**) Rescue of migration defects in organotypic slices (E16 + 2 days *in vitro*) taken from *Srpx2*-silenced embryos in the presence of tubacin (2.5 μM), as compared with its inactive homologue (niltubacin) applied to each adjacent slice (14 and 12 slices from 10 embryos, respectively). Fluorescence intensities reflecting cell positions were converted into grey values and measured across each slice. Histograms represent the mean ± SEM of fluorescence intensities in five regions (R1–R5), from the ventricle to the pia (normalized as a percentage). Mann Whitney test, two-tailed. (**C**) Maternal tubacin administration after *in utero* electroporation rescued the altered neuronal cell distribution seen at E20 in the population of *Srpx2*-silenced (5'shSrpx2 + RFP) embryos ($n = 19$) DMSO

(continued)

Downloaded from http://brain.oxfordjournals.org/ by guest on November 8, 2015

embryonic migration disorder and its associated long-term epileptiform consequences.

Discussion

In the present study, the role of sushi-repeat containing protein SRPX2 in the development of the rat cerebral cortex was shown by demonstrating that the acute inactivation of *Srpx2* in the developing cortex led to altered radial neuronal migration. Despite some obvious limitations common to most rodent models, such as the differences between the gyric human and the smooth rat cortices (Lui *et al.*, 2011), and the inherent human-specific features of the speech cortex, our data strongly support a similar role for the human SRPX2 counterpart. We had previously reported on the two missense *SRPX2* mutations that were studied here, in two different, albeit related epileptic disorders of the speech cortex (Roll *et al.*, 2006). As previously mentioned, the direct causal role of the p.N327S SRPX2 mutation in the family with Rolandic epilepsy and verbal dyspraxia was very recently challenged by the detection of a familial co-inheritance of another missense mutation in the *GRIN2A* gene (Lesca *et al.*, in revision), which we found in most, but not all, patients who had also inherited the p.N327S SRPX2 mutation. How those two *GRIN2A* and *SRPX2* mutations might independently or synergistically influence the three epileptic, speech and cognitive components in this family represents a complex issue. From this viewpoint, the data that were obtained here demonstrate that the expression of the mutant p.N327S-SRPX2 protein actually leads to impaired development of the cerebral cortex and to post-natal epileptiform activity, which is consistent with the actual influence of this mutation in at least a part of the corresponding human phenotype. Overall, the present analysis of the two *SRPX2* mutations indicated that they both can have strong and convergent functional impacts. Hence neuronal migration defects might not only participate in bilateral perisylvian polymicrogyria, as expected, but might also influence the phenotype of Rolandic epilepsy with verbal dyspraxia. Indeed, various neuroimaging anomalies including white matter anomalies, enlargement of lateral ventricles, biopercular polymicrogyria (Lundberg *et al.*, 1999; Gelisse *et al.*, 2003), and more recently increased cortical thickness and grey matter volume including areas associated with language (Pardoe *et al.*, 2013), have been observed in patients with Rolandic epilepsy.

Srpx2 silencing *in utero* led to persistent mispositioning of projection neurons and to spontaneous epileptiform activity in *Srpx2*-silenced neuronal networks post-natally. A similar situation was seen with expression of the dominant-negative mutant p.N327S-SRPX2 protein. This is in line with the paradigmatic developmental origin of various brain diseases and with the so-called 'neuroarcheology' concept (Ben-Ari, 2008). Interestingly, synchronized bursts were recorded from pairs of electroporated and non-electroporated neurons. The situation may somehow recall the abnormal network activity recorded in misplaced neurons and their target areas in layers II–III in a rat model of cortical heterotopia (Ackman *et al.*, 2009). Not exclusively and despite the lack of a detectable non-cell autonomous effect of *Srpx2* silencing on tubulin acetylation *in vitro* and on neuronal migration in BrdU-based experiments *in vivo*, altered migration of a subset of non-electroporated neuronal cells might also occur, particularly in the context of a secreted protein. It is noteworthy that the cell-autonomous action of a secreted protein (BDNF, brain-derived neurotrophic factor) on neuronal cell polarity has already been demonstrated (Cheng *et al.*, 2011). Nevertheless, increased excitatory glutamatergic bursting activity was observed in the *Srpx2*-silenced rat brain slices. Hence our findings are consistent with the increased susceptibility to chemically-induced seizures seen here. Our data also suggest that the present rat model of altered migration of projection neurons may at least partly recapitulate the pathophysiology of the seizures caused by early alteration of the cerebral cortex in human.

The dynamics of the microtubule cytoskeleton plays a crucial role in neuronal migration. We not only show here that SRPX2 influences neuronal migration, but also that it increases acetylation of alpha-tubulin. How extracellular SRPX2 exerts this effect warrants further investigation and is beyond the scope of the present study. The cascade of signalling events from extracellular SRPX2 to tubulin acetylation is likely to be pluriform and very complex. Indeed, SRPX2 has numerous possible partners in the extracellular matrix and at the plasma membrane (Royer-Zemmour *et al.*, 2008) and might influence neuronal migration through several different and non-exclusive pathways. For instance, previous studies have shown that SRPX2 modifies the phosphorylation of focal adhesion kinase (FAK) (Tanaka *et al.*, 2009), which plays a well-known role in cell migration and participates in microtubule stabilization (Palazzo *et al.*, 2004). Focal adhesion kinase activity, in turn, can be modulated by the urokinase plasminogen activator receptor uPAR (Tang *et al.*, 1998), which is a SRPX2 receptor (Royer-Zemmour *et al.*, 2008). Also, whether the effects of SRPX2 on tubulin acetylation could be influenced by uPAR, depended on the cell line that was analysed here. Not exclusively, it was also recently proposed that SRPX2 is a chondroitin sulphate proteoglycan (CSPG) (Tanaka *et al.*, 2012); CSPGs are prominent

Figure 5 Continued
(vehicle) had no effect ($n = 12$). Tubacin was injected intraperitoneally to the mother 24 and 48 h after *in utero* electroporations of the embryonic cerebral cortices. Kruskall-Wallis test followed by Mann Whitney test, two-tailed, with Bonferroni correction. Values represent mean ± SEM. (**D**) Tubacin administration rescued 15 of 19 *Srpx2*-silenced embryos. The vehicle (DMSO) had no effect ($n = 12$) ($P = 0.000016$, Fisher's exact test, two-tailed). For each zone at E20, a given *Srpx2*-silenced embryo (dot) from DMSO and tubacin experiments was compared with the 10th and 90th percentiles of the control (CTL, dark grey box) and the 5′shSrpx2 (white box) box-and-whisker plots, respectively. White dots: no rescue. Light grey dots: partial rescue. Dark grey dots: complete rescue. Embryos were numbered 1 to 19. Summary of statistics is in Supplementary Table 1. Hoescht = blue staining. Scale bars: white = 100 μm; red = 150 μm.

Downloaded from http://brain.oxfordjournals.org/ by guest on November 8, 2015

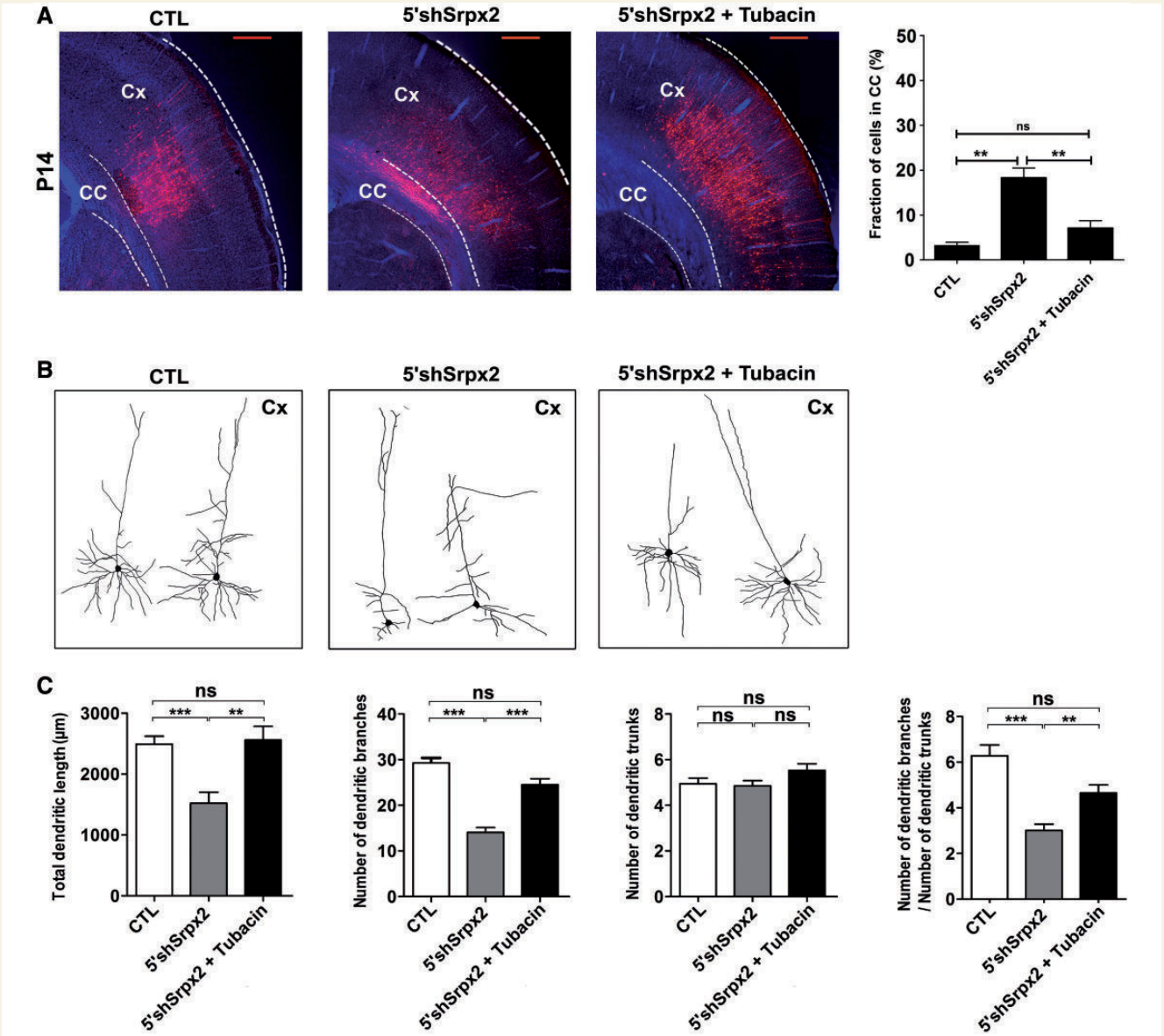


Figure 6 *Srpx2* silencing *in utero* causes post-natal morphological abnormalities that are prevented by maternal tubacin administration. (**A**) Tubacin administration during pregnancy significantly decreases the number of ectopic neurons in *Srpx2*-silenced post-natal Day 14 (P14) rats. Histograms represent the proportion of cells in the corpus callosum (CC). Values represent mean ± SEM from 9–17 post-natal Day 14 (P14) rats. Mann Whitney test, two-tailed, Bonferroni correction. Cx = cortex. Scale bar: red = 500 µm. (**B**) NeuronJ-tracings of differentiated neurons from P14-cortices of rats electroporated at embryonic Day 15 in control (CTL) and in silencing conditions (5′shSrpx2), with or without tubacin. (**C**) Histograms illustrating dendritic parameters of electroporated neurons. Reduced dendritic length, number and branching seen in *Srpx2*-silenced cortical neurons at post-natal Day 14, was prevented by tubacin after *in utero* 5′shSrpx2 electroporation. All dendritic values represent the mean ± SEM of 17 to 20 neurons randomly chosen from 3–7 independent experiments. Kruskall-Wallis test followed by Mann-Whitney test, two-tailed, with Bonferroni correction. Summary of statistics is in Supplementary Table 1.

components of the CNS and can influence neuronal migration (Carulli *et al.*, 2005). Hence and in addition to its influence on tubulin acetylation, SRPX2 very likely has other functions, some of which might also interfere with cell polarity and migration. Nevertheless and despite this inherent complexity, successful *ex vivo* and *in vivo* rescues of the migration phenotype caused by *Srpx2* silencing were obtained with tubacin, a specific inhibitor of tubulin deacetylase HDAC6. Whereas an acetylation-independent effect of HDAC6 inhibition on microtubule dynamics (Zilberman *et al.*, 2009) or on other molecular targets (Valenzuela-Fernandez *et al.*, 2008) cannot be ruled out, the efficacy of tubacin indicated that SRPX2 very likely influences neuronal migration at least partly through its action on alpha-tubulin acetylation. As a matter of fact, the phenotype caused by *Srpx2* silencing recalled the

Downloaded from http://brain.oxfordjournals.org/ by guest on November 8, 2015

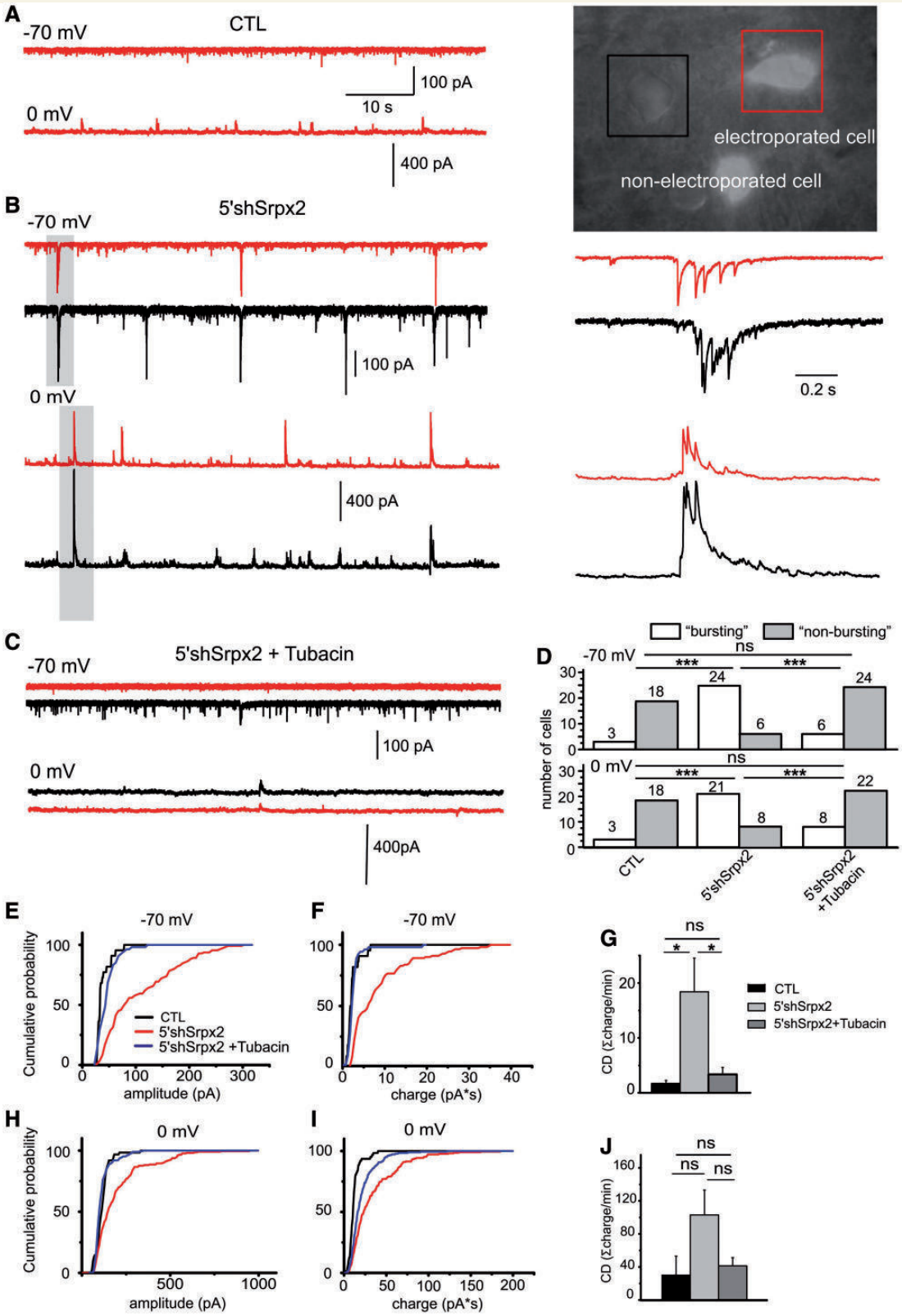


Figure 7 Short maternal tubacin treatment *in utero* prevents the postnatal neuronal spontaneous epileptiform activity in neocortical slices. Whole-cell voltage clamp recordings from individual neurons were performed in acute neocortical brain slices taken from post-natal Day 14 (P14) rats electroporated *in utero* at embryonic Day 15. CTL = control electroporation. 5′shSrpx2: *Srpx2* silencing. 5′shSrpx2 + Tubacin: *Srpx2* silencing treated with tubacin. (**A–C**) Representative traces of glutamatergic and GABAergic spontaneous activities recorded at membrane potentials −70 mV (spontaneous excitatory postsynaptic current) and 0 mV (spontaneous inhibitory postsynaptic

(continued)

Downloaded from http://brain.oxfordjournals.org/ by guest on November 8, 2015

Mec-17 (*Atat1*) acetyltransferase gene knock-down model (Li *et al.*, 2012), and the migration defects caused by *Srpx2* knock-down could indeed be significantly rescued *in vivo* by Mec-17 overexpression. Also, the data obtained here with the two mutant SRPX2 proteins indicate that an impairment of alpha-tubulin acetylation might participate in the related human phenotypes. Generally, alpha and beta-tubulins, microtubule-regulating proteins including EFHC1, LIS1 and DCX, and tubulin modifiers such as members of the Elongator complex, play crucial roles in the development of the brain cortex and in its pathology in humans, including polymicrogyria (Creppe *et al.*, 2009; de Nijs *et al.*, 2009; Jaglin and Chelly, 2009; Wynshaw-Boris *et al.*, 2010; Manzini and Walsh, 2011). Notably, Elongator is a multi-tasking complex of six subunits that is involved in the development of the cerebral cortex and in neuronal migration, and has intrinsic lysine acetyl-transferase activity (Creppe *et al.*, 2009). Whereas no pathogenic mutation was detected previously in *SRPX2* in typical, so-called benign Rolandic epilepsy (Roll *et al.*, 2006), or in the *ELP4* Elongator subunit gene as done here in a series of 36 patients with various related and more severe disorders of the Rolandic epilepsy spectrum (Rudolf *et al.*, 2009) (data not shown), one study has reported on the possible genetic association of *ELP4* with increased risk to Rolandic epilepsy (Strug *et al.*, 2009). Moreover, genomic duplications encompassing tubulin deacetylase gene *HDAC6* were detected in patients with intellectual disability, speech delay, seizures and Rolandic-like focal electroencephalographic paroxysms (Giorda *et al.*, 2009).

The attenuation of a developmental neuronal migration disorder and of subsequent seizure susceptibility has already been obtained *in vivo* in a rat model of *Dcx* knock-down by vector-based inducible re-expression rescue experiments at early post-natal stages (Manent *et al.*, 2009). Apart from epilepsy, motor behaviour manifestations could be prevented in a *Lis1*$^{+/-}$ mouse model of neuronal migration disorder by prenatal injections of calpain inhibitor to the pregnant mice (Yamada *et al.*, 2009). In the present model of *Srpx2* silencing, the post-natal epileptiform consequences were prevented by maternal drug delivery during pregnancy; indeed, tubacin significantly improved the positioning of the *Srpx2*-silenced neurons, and this was accompanied with functional neuronal network recovery, at least at post-natal Day 14 and according to the recordings done here. The reason why a minor subset of the littermates did not apparently respond to tubacin, at least anatomically at embryonic Day 20, is unknown. Variability in tubacin transfer across the placental or blood–brain barriers cannot be excluded. Indeed, the inherently-transient biochemical effects of tubacin varied among embryos. Importantly also, administration of tubacin during a short time-period was sufficient enough for efficient prevention. Such a transient tubacin treatment led to complete rescue at the morphological and electrophysiological levels in the majority of cases, whereas significant, albeit less-pronounced rescue was obtained *in vivo* with vector-based re-expression of Mec-17 acetyl transferase. This suggests that the level and/or the duration of increased acetylation likely influences the efficacy of the treatment. It is noteworthy that our drug-based protocol did not yield any obvious dramatic adverse effect either in the pregnant rat or in its progeny, at least until post-natal Day 14. This is also in line with the viability and normal development of *Hdac6* knock-out mice (Zhang *et al.*, 2008). No gross side effect on cell proliferation or migration of tubacin as injected here, was observed; this apparent harmlessness might well be related to the very transient and soft features (two shots only) of the therapy. Obviously other or more subtle adverse effects cannot be excluded; as an example, the mitotic index of neural cell progenitors might be modified after acute *Hdac6* inactivation in the developing brain cortex (Li *et al.*, 2011). Also, one important challenge will involve expanding the present findings to other models of neuronal migration disorders, and testing other protocols and drugs that target microtubules, such as taxol-related molecules.

Histone deacetylase inhibitors that target tubulin (Schemies *et al.*, 2009) have been proposed for the development of new therapies in human diseases (Kazantsev and Thompson, 2008) and have already been employed post-natally in animal models for neurological disorders (d'Ydewalle *et al.*, 2011). Generally the prevention or attenuation of brain developmental defects should be carried out as early as possible, before the long-term clinical consequences appear later in life, and before the developmental window for such an intervention closes—hence before birth in humans. As future progress in developmental neuroimaging (Glenn and Barkovich, 2006; Studholme, 2011) and in prenatal genetic diagnosis (Bianchi, 2012) can be anticipated, the successful *in utero* prevention of the post-natal epileptiform consequences of a neuronal migration disorder by a drug targeting tubulin deacetylase, as obtained here in a rat model, might be of broad putative interest given the known convergence of multiple neuronal migration pathways and disorders on alpha-tubulins.

Figure 7 Continued
current), respectively, from electroporated (red) and neighbouring non-electroporated (black) neurons in brain slices from control (**A**), 5′shSrpx2 (**B**) and 5′shSrpx2 + tubacin (**C**) rats. In (**B**) individual bursts (highlighted, grey boxes) are shown on the right at an extended time scale. Recordings were made simultaneously from two neurons. Note that some bursts are synchronized between two cells. (**D**) The increase in the number of bursting neurons caused by *Srpx2* silencing was prevented by tubacin treatment. The numbers of neurons with spontaneous excitatory postsynaptic current (*top*) and spontaneous inhibitory postsynaptic current (*bottom*) interictal-like bursts are presented. Fisher's exact test, two-tailed, Bonferroni correction. (**E**, **F**, **H** and **I**) The increase in values of maximal amplitudes and charge transfer (charge) of spontaneous excitatory postsynaptic current (**E** and **F**) and spontaneous inhibitory postsynaptic current (**H** and **I**) bursts caused by *Srpx2* silencing, was prevented by tubacin treatment. The cumulative probabilities of maximal amplitudes (**E** and **H**) and charge transfer (**F** and **I**) of individual spontaneous excitatory postsynaptic current and spontaneous inhibitory postsynaptic current bursts are shown. CTL = black; 5′shSrpx2 = red; 5′shSrpx2 + Tubacin = blue. (**G**) The increase in spontaneous excitatory postsynaptic current integral burst charge densities (CD) seen in silencing condition was prevented by tubacin treatment. Kruskall-Wallis test, *post hoc* Dunn's multiple comparison test. (**J**) No significant difference in spontaneous inhibitory postsynaptic current integral burst CD between control, silencing and treatment conditions. Summary of statistics is in Supplementary Table 1.

Downloaded from http://brain.oxfordjournals.org/ by guest on November 8, 2015

Acknowledgements

We thank F. Michel at inMAGIC (INMED Imaging Centre), F. Bader and S. Corby (Animal core facilities), and all the administrative staff at INMED. Pax-6 antibody was kindly provided by H. Cremer (IBDML, Marseille). Expert assistance from C. Matthews (PICsL platform, Luminy campus, Marseille) and L. Espinoza (IFR125, Timone campus, Marseille) was greatly appreciated. Special thanks to L. Castelein, C. Gueniot, M. Graille, P. Fritsch and J. Tisserand for their help as trainees. Image J plugin manual tracking was kindly provided by F. Cordelières (Institut Curie, Orsay, France).

Funding

This work was supported by INSERM (Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale), by ANR (Agence Nationale de la Recherche) grant EPILAND (ANR-2010- Blanc-140501) with EuroBioMed labeling, by FRC (Fédération pour la Recherche sur le Cerveau) grant ("Srpx2 function", call 2007) and by FRM (Fondation pour la Recherche Médicale) grant ("Physiology and pathology of brain development", call 2012). R.C. is a recipient of an INSERM/PACA (Provence-Alpes-Côte d'Azur) Regional Council PhD fellowship and J.C. has been a recipient of a MRT (Ministère de la Recherche et de la Technologie) PhD fellowship.

Supplementary material

Supplementary material is available at *Brain* online.

References

Ackman JB, Aniksztejn L, Crepel V, Becq H, Pellegrino C, Cardoso C, et al. Abnormal network activity in a targeted genetic model of human double cortex. J Neurosci 2009; 29: 313–27.

Akella JS, Wloga D, Kim J, Starostina NG, Lyons-Abbott S, Morrissette NS, et al. MEC-17 is an alpha-tubulin acetyltransferase. Nature 2010; 467: 218–22.

Andrade DM. Genetic basis in epilepsies caused by malformations of cortical development and in those with structurally normal brain. Hum Genet 2009; 126: 173–93.

Bai J, Ramos RL, Ackman JB, Thomas AM, Lee RV, LoTurco JJ. RNAi reveals doublecortin is required for radial migration in rat neocortex. Nat Neurosci 2003; 6: 1277–83.

Barkovich AJ, Guerrini R, Kuzniecky RI, Jackson GD, Dobyns WB. A developmental and genetic classification for malformations of cortical development: update 2012. Brain 2012; 135: 1348–69.

Ben-Ari Y. Neuro-archaeology: pre-symptomatic architecture and signature of neurological disorders. Trends Neurosci 2008; 31: 626–36.

Bianchi DW. From prenatal genomic diagnosis to fetal personalized medicine: progress and challenges. Nat Med 2012; 18: 1041–51.

Biermann B, Ivankova-Susankova K, Bradaia A, Abdel Aziz S, Besseyrias V, Kapfhammer JP, et al. The Sushi domains of GABAB receptors function as axonal targeting signals. J Neurosci 2010; 30: 1385–94.

Bruneau N, Nganga A, Fisher EA, Lombardo D. O-Glycosylation of C-terminal tandem-repeated sequences regulates the secretion of rat pancreatic bile salt-dependent lipase. J Biol Chem 1997; 272: 27353–61.

Bruneau N, Szepetowski P. The role of the urokinase receptor in epilepsy, in disorders of language, cognition, communication and behavior, and in the central nervous system. Curr Pharm Des 2011; 17: 1914–23.

Carabalona A, Beguin S, Pallesi-Pocachard E, Buhler E, Pellegrino C, Arnaud K, et al. A glial origin for periventricular nodular heterotopia caused by impaired expression of Filamin-A. Hum Mol Genet 2012; 21: 1004–17.

Carulli D, Laabs T, Geller HM, Fawcett JW. Chondroitin sulfate proteoglycans in neural development and regeneration. Curr Opin Neurobiol 2005; 15: 116–20.

Cheng PL, Song AH, Wong YH, Wang S, Zhang X, Poo MM. Self-amplifying autocrine actions of BDNF in axon development. Proc Natl Acad Sci USA 2011; 108: 18430–5.

Creppe C, Malinouskaya L, Volvert ML, Gillard M, Close P, Malaise O, et al. Elongator controls the migration and differentiation of cortical neurons through acetylation of alpha-tubulin. Cell 2009; 136: 551–64.

D'Mello V, Singh S, Wu Y, Birge RB. The urokinase plasminogen activator receptor promotes efferocytosis of apoptotic cells. J Biol Chem 2009; 284: 17030–8.

d'Ydewalle C, Krishnan J, Chiheb DM, Van Damme P, Irobi J, Kozikowski AP, et al. HDAC6 inhibitors reverse axonal loss in a mouse model of mutant HSPB1-induced Charcot-Marie-Tooth disease. Nat Med 2011; 17: 968–74.

de Nijs L, Leon C, Nguyen L, Loturco JJ, Delgado-Escueta AV, Grisar T, et al. EFHC1 interacts with microtubules to regulate cell division and cortical development. Nat Neurosci 2009; 12: 1266–74.

Elias LA, Wang DD, Kriegstein AR. Gap junction adhesion is necessary for radial migration in the neocortex. Nature 2007; 448: 901–7.

Gelisse P, Corda D, Raybaud C, Dravet C, Bureau M, Genton P. Abnormal neuroimaging in patients with benign epilepsy with centro-temporal spikes. Epilepsia 2003; 44: 372–8.

Gendrel M, Rapti G, Richmond JE, Bessereau JL. A secreted complement-control-related protein ensures acetylcholine receptor clustering. Nature 2009; 461: 992–6.

Giorda R, Bonaglia MC, Beri S, Fichera M, Novara F, Magini P, et al. Complex segmental duplications mediate a recurrent dup(X)(p11.22–p11.23) associated with mental retardation, speech delay, and EEG anomalies in males and females. Am J Hum Genet 2009; 85: 394–400.

Glenn OA, Barkovich J. Magnetic resonance imaging of the fetal brain and spine: an increasingly important tool in prenatal diagnosis: part 2. Am J Neuroradiol 2006; 27: 1807–14.

Guerrini R, Dobyns WB, Barkovich AJ. Abnormal development of the human cerebral cortex: genetics, functional consequences and treatment options. Trends Neurosci 2008; 31: 154–62.

Gunnersen JM, Kim MH, Fuller SJ, De Silva M, Britto JM, Hammond VE, et al. Sez-6 proteins affect dendritic arborization patterns and excitability of cortical pyramidal neurons. Neuron 2007; 56: 621–39.

Haggarty SJ, Koeller KM, Wong JC, Grozinger CM, Schreiber SL. Domain-selective small-molecule inhibitor of histone deacetylase 6 (HDAC6)-mediated tubulin deacetylation. Proc Natl Acad Sci USA 2003; 100: 4389–94.

Heng JI, Chariot A, Nguyen L. Molecular layers underlying cytoskeletal remodelling during cortical development. Trends Neurosci 2009; 33: 38–47.

Heng JI, Nguyen L, Castro DS, Zimmer C, Wildner H, Armant O, et al. Neurogenin 2 controls cortical neuron migration through regulation of Rnd2. Nature 2008; 455: 114–8.

Jaglin XH, Chelly J. Tubulin-related cortical dysgeneses: microtubule dysfunction underlying neuronal migration defects. Trends Genet 2009; 25: 555–66.

Jaglin XH, Poirier K, Saillour Y, Buhler E, Tian G, Bahi-Buisson N, et al. Mutations in the beta-tubulin gene TUBB2B result in asymmetrical polymicrogyria. Nat Genet 2009; 41: 746–52.

Jansen A, Andermann E. Genetics of the polymicrogyria syndromes. J Med Genet 2005; 42: 369–78.

Kazantsev AG, Thompson LM. Therapeutic application of histone deacetylase inhibitors for central nervous system disorders. Nat Rev Drug Discov 2008; 7: 854–68.

Downloaded from http://brain.oxfordjournals.org/ by guest on November 8, 2015

Keays DA, Tian G, Poirier K, Huang GJ, Siebold C, Cleak J, et al. Mutations in alpha-tubulin cause abnormal neuronal migration in mice and lissencephaly in humans. Cell 2007; 128: 45–57.

Kriegstein AR. Constructing circuits: neurogenesis and migration in the developing neocortex. Epilepsia 2005; 46 (Suppl 7): 15–21.

Kumar RA, Pilz DT, Babatz TD, Cushion TD, Harvey K, Topf M, et al. TUBA1A mutations cause wide spectrum lissencephaly (smooth brain) and suggest that multiple neuronal migration pathways converge on alpha tubulins. Hum Mol Genet 2010; 19: 2817–27.

Li A, Saito M, Chuang JZ, Tseng YY, Dedesma C, Tomizawa K, et al. Ciliary transition zone activation of phosphorylated Tctex-1 controls ciliary resorption, S-phase entry and fate of neural progenitors. Nat Cell Biol 2011; 13: 402–11.

Li L, Wei D, Wang Q, Pan J, Liu R, Zhang X, et al. MEC-17 deficiency leads to reduced alpha-tubulin acetylation and impaired migration of cortical neurons. J Neurosci 2012; 32: 12673–83.

Lui JH, Hansen DV, Kriegstein AR. Development and evolution of the human neocortex. Cell 2011; 146: 18–36.

Lundberg S, Eeg-Olofsson O, Raininko R, Eeg-Olofsson KE. Hippocampal asymmetries and white matter abnormalities on MRI in benign childhood epilepsy with centrotemporal spikes. Epilepsia 1999; 40: 1808–15.

Manent JB, LoTurco J. Reversing disorders of neuronal migration and differentiation in animal models. In: Noebels JL, Avoli M, Rogawski MA, Olsen RW, Delgado-Escueta AV, editors. Jasper's Basic Mechanisms of the Epilepsies. 4th edn. Bethesda, MD: National Center for Biotechnology Information; 2012.

Manent JB, Wang Y, Chang Y, Paramasivam M, LoTurco JJ. Dcx reexpression reduces subcortical band heterotopia and seizure threshold in an animal model of neuronal migration disorder. Nat Med 2009; 15: 84–90.

Manzini MC, Walsh CA. What disorders of cortical development tell us about the cortex: one plus one does not always make two. Curr Opin Genet Dev 2011; 21: 333–9.

Marin O, Rubenstein JL. Cell migration in the forebrain. Annu Rev Neurosci 2003; 26: 441–83.

Miljkovic-Licina M, Hammel P, Garrido-Urbani S, Bradfield PF, Szepetowski P, Imhof BA. Sushi repeat protein X-linked 2, a novel mediator of angiogenesis. FASEB J 2009; 23: 4105–16.

Palazzo AF, Eng CH, Schlaepfer DD, Marcantonio EE, Gundersen GG. Localized stabilization of microtubules by integrin- and FAK-facilitated Rho signaling. Science 2004; 303: 836–9.

Paracchini S, Thomas A, Castro S, Lai C, Paramasivam M, Wang Y, et al. The chromosome 6p22 haplotype associated with dyslexia reduces the expression of KIAA0319, a novel gene involved in neuronal migration. Hum Mol Genet 2006; 15: 1659–66.

Pardoe HR, Berg AT, Archer JS, Fulbright RK, Jackson GD. A neurodevelopmental basis for BECTS: Evidence from structural MRI. Epilepsy Res 2013; pii: S0920–1211(13)00010–7. doi: 10.1016/j.eplepsyres.2012.11.008.

Pereira S, Massacrier A, Roll P, Verine A, Etienne-Grimaldi MC, Poitelon Y, et al. Nuclear localization of a novel human syntaxin 1B isoform. Gene 2008; 423: 160–71.

Ramos RL, Bai J, LoTurco JJ. Heterotopia formation in rat but not mouse neocortex after RNA interference knockdown of DCX. Cereb Cortex 2006; 16: 1323–31.

Roll P, Rudolf G, Pereira S, Royer B, Scheffer IE, Massacrier A, et al. SRPX2 mutations in disorders of language cortex and cognition. Hum Mol Genet 2006; 15: 1195–207.

Roll P, Vernes SC, Bruneau N, Cillario J, Ponsole-Lenfant M, Massacrier A, et al. Molecular networks implicated in speech-related disorders: FOXP2 regulates the SRPX2/uPAR complex. Hum Mol Genet 2010; 19: 4848–60.

Royer-Zemmour B, Ponsole-Lenfant M, Gara H, Roll P, Leveque C, Massacrier A, et al. Epileptic and developmental disorders of the speech cortex: ligand/receptor interaction of wild-type and mutant SRPX2 with the plasminogen activator receptor uPAR. Hum Mol Genet 2008; 17: 3617–30.

Rubenstein JL. Annual research review: development of the cerebral cortex: implications for neurodevelopmental disorders. J Child Psychol Psychiatry 2011; 52: 339–55.

Rubenstein JL, Rakic P. Genetic control of cortical development. Cereb Cortex 1999; 9: 521–3.

Rudolf G, Valenti MP, Hirsch E, Szepetowski P. From rolandic epilepsy to continuous spike-and-waves during sleep and Landau-Kleffner syndromes: insights into possible genetic factors. Epilepsia 2009; 50 (Suppl 7): 25–8.

Schemies J, Sippl W, Jung M. Histone deacetylase inhibitors that target tubulin. Cancer Lett 2009; 280: 222–32.

Sessa A, Mao CA, Colasante G, Nini A, Klein WH, Broccoli V. Tbr2-positive intermediate (basal) neuronal progenitors safeguard cerebral cortex expansion by controlling amplification of pallial glutamatergic neurons and attraction of subpallial GABAergic interneurons. Genes Dev 2010; 24: 1816–26.

Strug LJ, Clarke T, Chiang T, Chien M, Baskurt Z, Li W, et al. Centrotemporal sharp wave EEG trait in rolandic epilepsy maps to Elongator Protein Complex 4 (ELP4). Eur J Hum Genet 2009; 17: 1171–81.

Studholme C. Mapping fetal brain development in utero using magnetic resonance imaging: the Big Bang of brain mapping. Annu Rev Biomed Eng 2011; 13: 345–68.

Sudo H, Baas PW. Acetylation of microtubules influences their sensitivity to severing by katanin in neurons and fibroblasts. J Neurosci 2010; 30: 7215–26.

Tanaka K, Arao T, Maegawa M, Matsumoto K, Kaneda H, Kudo K, et al. SRPX2 is overexpressed in gastric cancer and promotes cellular migration and adhesion. Int J Cancer 2009; 124: 1072–80.

Tanaka K, Arao T, Tamura D, Aomatsu K, Furuta K, Matsumoto K, et al. SRPX2 is a novel chondroitin sulfate proteoglycan that is overexpressed in gastrointestinal cancer. PLoS One 2012; 7: e27922.

Tang H, Kerins DM, Hao Q, Inagami T, Vaughan DE. The urokinase-type plasminogen activator receptor mediates tyrosine phosphorylation of focal adhesion proteins and activation of mitogen-activated protein kinase in cultured endothelial cells. J Biol Chem 1998; 273: 18268–72.

Valenzuela-Fernandez A, Cabrero JR, Serrador JM, Sanchez-Madrid F. HDAC6: a key regulator of cytoskeleton, cell migration and cell-cell interactions. Trends Cell Biol 2008; 18: 291–7.

Valiente M, Marin O. Neuronal migration mechanisms in development and disease. Curr Opin Neurobiol 2010; 20: 68–78.

Velisek L, Kubova H, Pohl M, Stankova L, Mares P, Schickerova R. Pentylenetetrazol-induced seizures in rats: an ontogenetic study. Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol 1992; 346: 588–91.

Wynshaw-Boris A, Pramparo T, Youn YH, Hirotsune S. Lissencephaly: mechanistic insights from animal models and potential therapeutic strategies. Semin Cell Dev Biol 2010; 21: 823–30.

Yamada M, Yoshida Y, Mori D, Takitoh T, Kengaku M, Umeshima H, et al. Inhibition of calpain increases LIS1 expression and partially rescues in vivo phenotypes in a mouse model of lissencephaly. Nat Med 2009; 15: 1202–7.

Yassin L, Benedetti BL, Jouhanneau JS, Wen JA, Poulet JF, Barth AL. An embedded subnetwork of highly active neurons in the neocortex. Neuron 2010; 68: 1043–50.

Yu JY, DeRuiter SL, Turner DL. RNA interference by expression of short-interfering RNAs and hairpin RNAs in mammalian cells. Proc Natl Acad Sci USA 2002; 99: 6047–52.

Zhang Y, Kwon S, Yamaguchi T, Cubizolles F, Rousseaux S, Kneissel M, et al. Mice lacking histone deacetylase 6 have hyperacetylated tubulin but are viable and develop normally. Mol Cell Biol 2008; 28: 1688–701.

Zhou Q, Gallo JM. Quantification of sunitinib in mouse plasma, brain tumor and normal brain using liquid chromatography-electrospray ionization-tandem mass spectrometry and pharmacokinetic application. J Pharm Biomed Anal 2010; 51: 958–64.

Zilberman Y, Ballestrem C, Carramusa L, Mazitschek R, Khochbin S, Bershadsky A. Regulation of microtubule dynamics by inhibition of the tubulin deacetylase HDAC6. J Cell Sci 2009; 122: 3531–41.

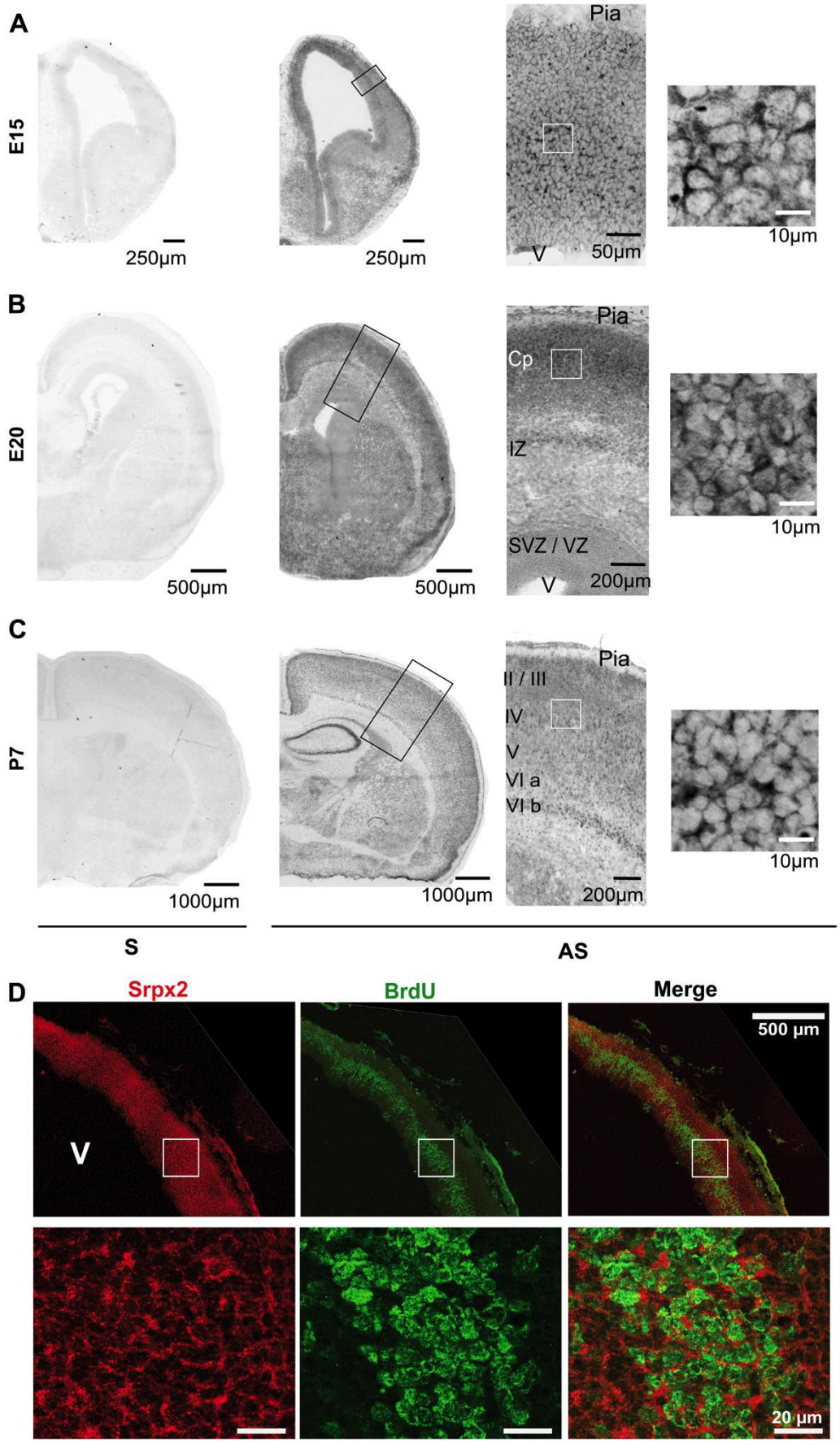
Downloaded from http://brain.oxfordjournals.org/ by guest on November 8, 2015

Supplementary Figure 1. Srpx2 is expressed in the developing cerebral cortex.

(A-C) *Srpx2* transcript distribution was determined by *in situ* hybridization in coronal sections of the telencephalon at various stages. (A): E15; (B): E20; (C): postnatal day 7 (P7). V: ventricle. VZ: ventricular zone. SVZ: subventricular zone. IZ: intermediate zone. Cp: cortical plate. AS: antisense probe. S: sense (control) probe. Note that the discrepancy observed in the relative distributions of Srpx2 mRNA expression as shown here, and Srpx2 protein expression as shown in Fig. 1, respectively, from the ventricle to the pia, likely reflected the involvement of post-transcriptional, translational, turnover and/or secretion regulatory processes, as recently reviewed (Vogel and Marcotte, 2012).

Supplementary methods. Embryonic and postnatal rat brain tissues were frozen with liquid-nitrogen vapors and stored at –80°C. Experiments were performed on cryosections (14 µm, Leica CM3050S cryostat). A riboprobe was generated from the 3' UTR of rat *Srpx2* cDNA by PCR (ISH primers) (Supplementary Table 2). Either of the two primers included a 21 bp-T7 tail at the 5' end for the generation of sense or antisense cRNA probes that were labelled and detected as described (Pereira *et al.*, 2008).

(D) The rat Srpx2 protein is expressed in the dorsal telencephalon in BrdU-positive (dividing) cells at E15. Srpx2 protein (red) was detected by immunohistochemistry in coronal sections of the telencephalon at embryonic day 15 (E15), in BrdU-positive cells (green). BrdU pulse was administrated 1h. before sacrifice. Close-up pictures of the ventricular zones in the pallium are shown V: ventricle. Fluorescence microscopy with ApoTome attachment.


A
E15
250µm
250µm
Pia
V
50µm
10µm
B
E20
500µm
500µm
Pia
Cp
IZ
SVZ / VZ
V
200µm
10µm
C
P7
1000µm
1000µm
Pia
II / III
IV
V
VI a
VI b
200µm
10µm
S
AS
D
Srpx2
BrdU
Merge
V
500 µm
20 µm

Supplementary Figure 2. Design and validation of rat *Srpx2* shRNAs.

(A) Candidate short hairpin (sh)RNAs for rat *Srpx2* were selected in the 5' (5'shSrpx2) and the 3' (3'shSrpx2) untranslated regions of the *Srpx2* transcript sequence and inserted into the mU6Pro vector. 5'm3shSrpx2 and 3'm3shSrpx2 correspond to the triple-mutant (ineffective) forms of their specific shRNAs counterparts with the position of the three mutations in bold. The specific shRNA target and mutated sequences did not match any known sequence apart from *Srpx2* in rat genomic and RNA non-redundant databases (BLAST search at NCBI, http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/). All sequences are indicated from 5' to 3' end. Nucleotide positions are indicated. ORF: open reading frame.

(B,C) The two specific shRNAs yielded similar and significant reduction in *Srpx2* gene expression whereas the two triple mutant counterparts were ineffective.

Knock-down of *Srpx2* was tested in rat C6 glioma cells co-transfected (Cell line Nucleofector kit V, Amaxa) with pmaxGFP and with either shSrpx2 construct or triple-point-mutated shRNA or non-recombinant mU6pro. Three to ten independent transfection tests with qRT-PCRs done in triplicate for each. Mann Whitney test, two-tailed (Supplementary Table 1).

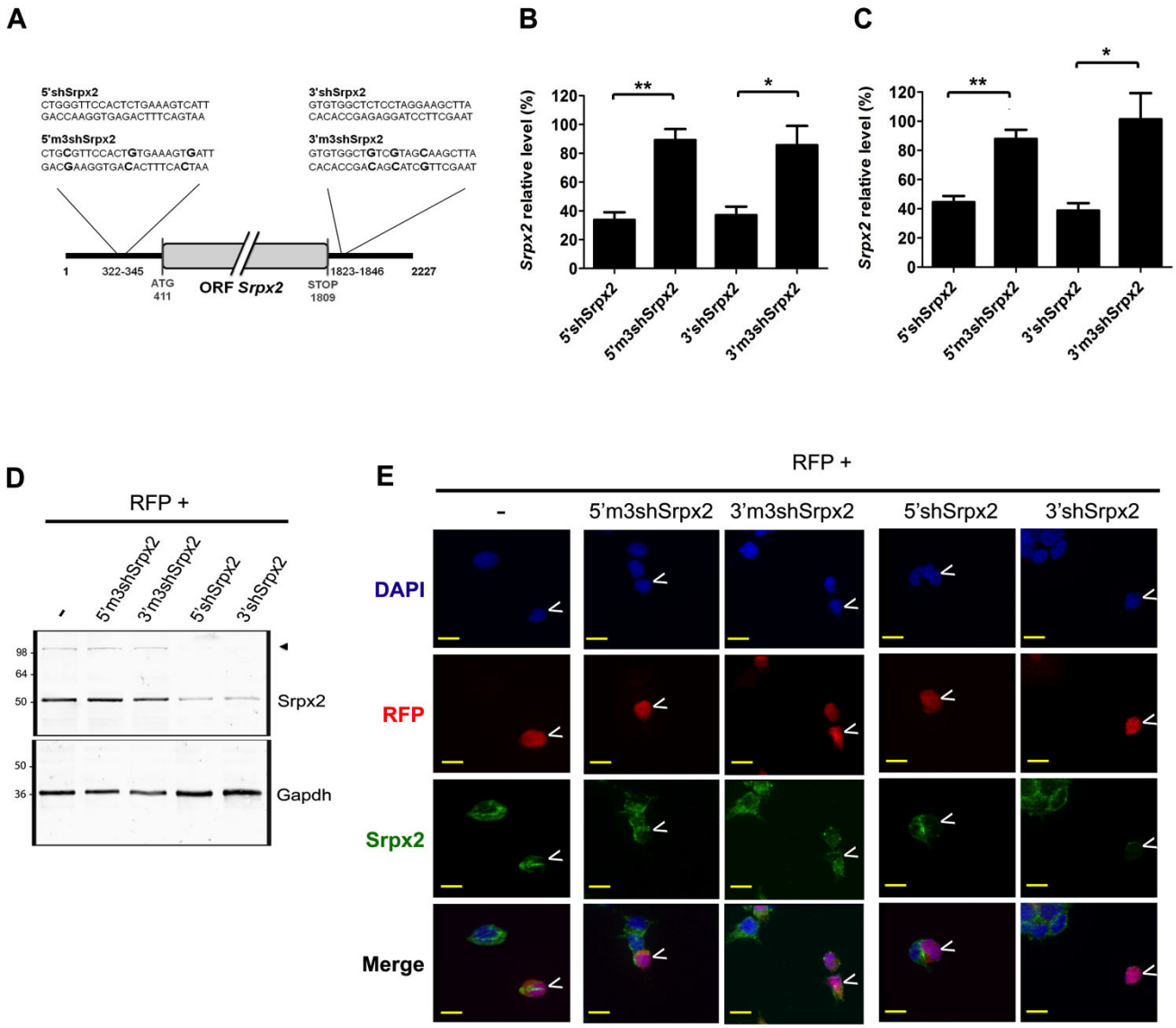
Supplementary methods. Total RNAs were extracted (TRIzol, Life technologies) and reverse-transcribed using random hexamers and the Superscript II RNase H reverse transcriptase (Life technologies). Quantitative RT-PCR (qRT-PCR) was optimized and carried out using LightCycler 480 SYBR Green I Master mix in the LightCycler 480 system (Roche). Standard curves were set up for all *Srpx2* and internal standard primers (Supplementary Table 2). *Srpx2* transcript levels were quantified by qRT-PCR and normalized to transcripts for ribosomal proteins S16 (Rps16) (B) or L23 (Rps23) (C). Fold changes were reported for cells transfected with either of shSrpx2 construct or triple-point-mutated shRNA construct and as compared with control cells transfected with non-recombinant vector. Quantification was calculated using the comparative CT method.

(D,E) The two specific shRNAs yielded significant reduction in Srpx2 protein expression whereas the two triple mutant counterparts were ineffective. Knock-down of *Srpx2* was validated in rat AR4-2J pancreatic tumor cells transfected with the appropriate constructs.

Supplementary methods. AR4-2J rat pancreatic tumor cells (CRL 1492, ATCC) were grown at 37°C in F-12K medium (Life Technologies) supplemented with 2 mM glutamine, 100 U/ml penicillin, 100 µg/ml streptomycin, 0.1% (v/v) fungizone, and 20% fetal calf serum (FCS). When cells reached 80% confluence, they were co-transfected with the appropriate shRNA construct and with GFP expression vector (pCAGGS-GFP, Addgene) with the Neon Transfection System (Life Technologies).

(D) Srpx2 protein (≅50 kDa) levels were estimated by Western blot with normalization to rat Gapdh protein. The arrowhead corresponds to the previously reported ≅100 kDa form (Tanaka *et al.*, 2009) (see also Supplementary Fig. 6). Decreased Srpx2 amounts were obtained with the silencing constructs (5'shSrpx2, 3'shSrpx2) as compared with control (-) and mutant (5'm3shSrpx2 and 3'm3shSrpx2) constructs.

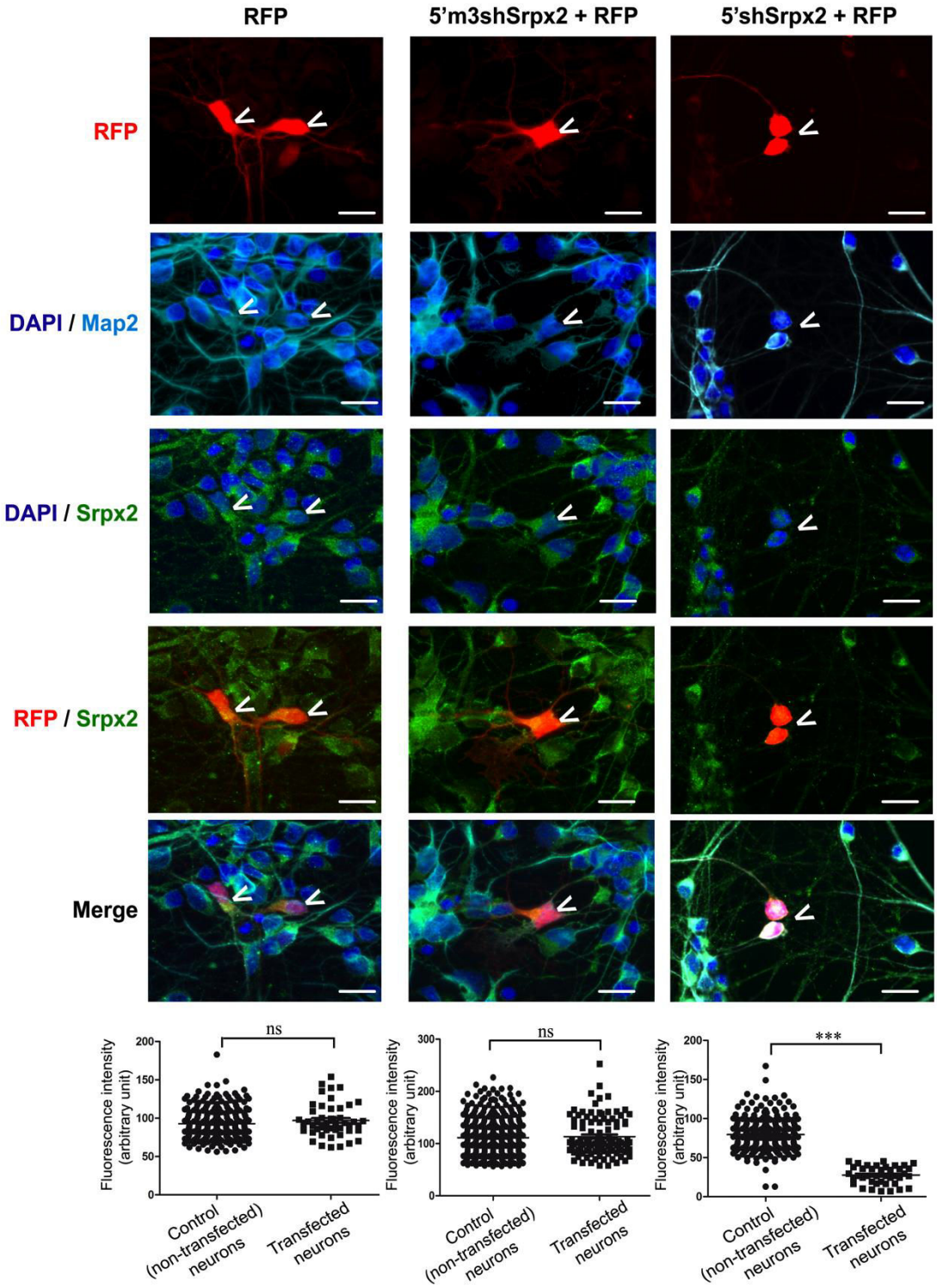
(E) Decreased expression of Srpx2 was shown by immunocytochemistry in cells transfected with RFP and with the silencing 5'shSrpx2 or 3'shSrpx2 constructs (arrowheads), as compared with neighboring non-transfected cells, whereas cells transfected with RFP alone (arrowheads) or with RFP and the corresponding triple-mutant constructs (5'm3shSrpx2 and 3'm3shSrpx2) (arrowheads) did not show decreased Srpx2 expression. Yellow bar: 10 µm.


A
5'shSrpx2
CTGGGTTCCACTCTGAAAGTCATT
GACCAAGGTGAGACTTTCAGTAA
5'm3shSrpx2
CTGCGTTCCACTGTGAAAGTGATT
GACGAAGGTGACACTTTCACTAA
3'shSrpx2
GTGTGGCTCTCCTAGGAAGCTTA
CACACCGAGAGGATCCTTCGAAT
3'm3shSrpx2
GTGTGGCTGTCGTAGCAAGCTTA
CACACCGACAGCATCGTTCGAAT
1
322-345
ATG
411
ORF Srpx2
STOP
1809
1823-1846
2227
B
Srpx2 relative level (%)
120
100
80
60
40
20
0
**
*
5'shSrpx2
5'm3shSrpx2
3'shSrpx2
3'm3shSrpx2
C
Srpx2 relative level (%)
120
100
80
60
40
20
0
**
*
5'shSrpx2
5'm3shSrpx2
3'shSrpx2
3'm3shSrpx2
D
RFP +
-
5'm3shSrpx2
3'm3shSrpx2
5'shSrpx2
3'shSrpx2
98
64
50
Srpx2
50
36
Gapdh
E
RFP +
-
5'm3shSrpx2
3'm3shSrpx2
5'shSrpx2
3'shSrpx2
DAPI
RFP
Srpx2
Merge

Supplementary Figure 3. Validation of *Srpx2* silencing in primary neuronal cells.

Knock-down of *Srpx2* was validated by immunocytochemistry in primary neuronal cells (Map2+) prepared from the cortex of 16-days-old Wistar rat embryos (E16) electroporated at E15 with the appropriate constructs. Srpx2 protein levels were quantified after four days in vitro by measuring anti-Srpx2 antibody fluorescence intensities (ImageJ) in the soma (arrowheads) of electroporated neuronal cells as compared with neighboring non-electroporated neuronal cells ($n \geq 30$ for each) in either silencing (5'shSrpx2) and control (RFP, 5'm3shSrpx2) conditions. Statistics: unpaired t-test, two-tailed (Supplementary Table 1). Nuclei are stained with DAPI. Fluorescence microscopy with ApoTome attachment. White bar: 10 µm.

Supplementary methods. Briefly, the animals were anesthetized with ketamine (0.8 mg/g rat weight) and sacrificed. The fetuses were delivered and decapitated. Every effort was made to optimize the comfort and minimize the use of animals. The cerebral cortex was dissected and cut into small pieces in DMEM medium, and the tissue was then dispersed with 0.25% trypsin–EDTA solutions for 15 min. The trypsin was then washed and the tissue was disrupted mechanically by pipetting. The cells were suspended in Neurobasal Medium (Life technologies) supplemented with B27 (2%), L-glutamine (2 mM), and antibiotics (penicillin 100 U/ml, streptomycin 100 µg/ml) and glucose (0,45%). The cells were counted and resuspended at a density of 200,000 cells/ml and seeded onto poly-L-lysine-coated plates. Cells were cultured four days long in humidified incubator at 37°C under 5% CO2 atmosphere.


RFP
5'm3shSrpx2 + RFP
5'shSrpx2 + RFP
RFP
DAPI / Map2
DAPI / Srpx2
RFP / Srpx2
Merge
Fluorescence intensity (arbitrary unit)
ns
ns
***
Control (non-transfected) neurons
Transfected neurons

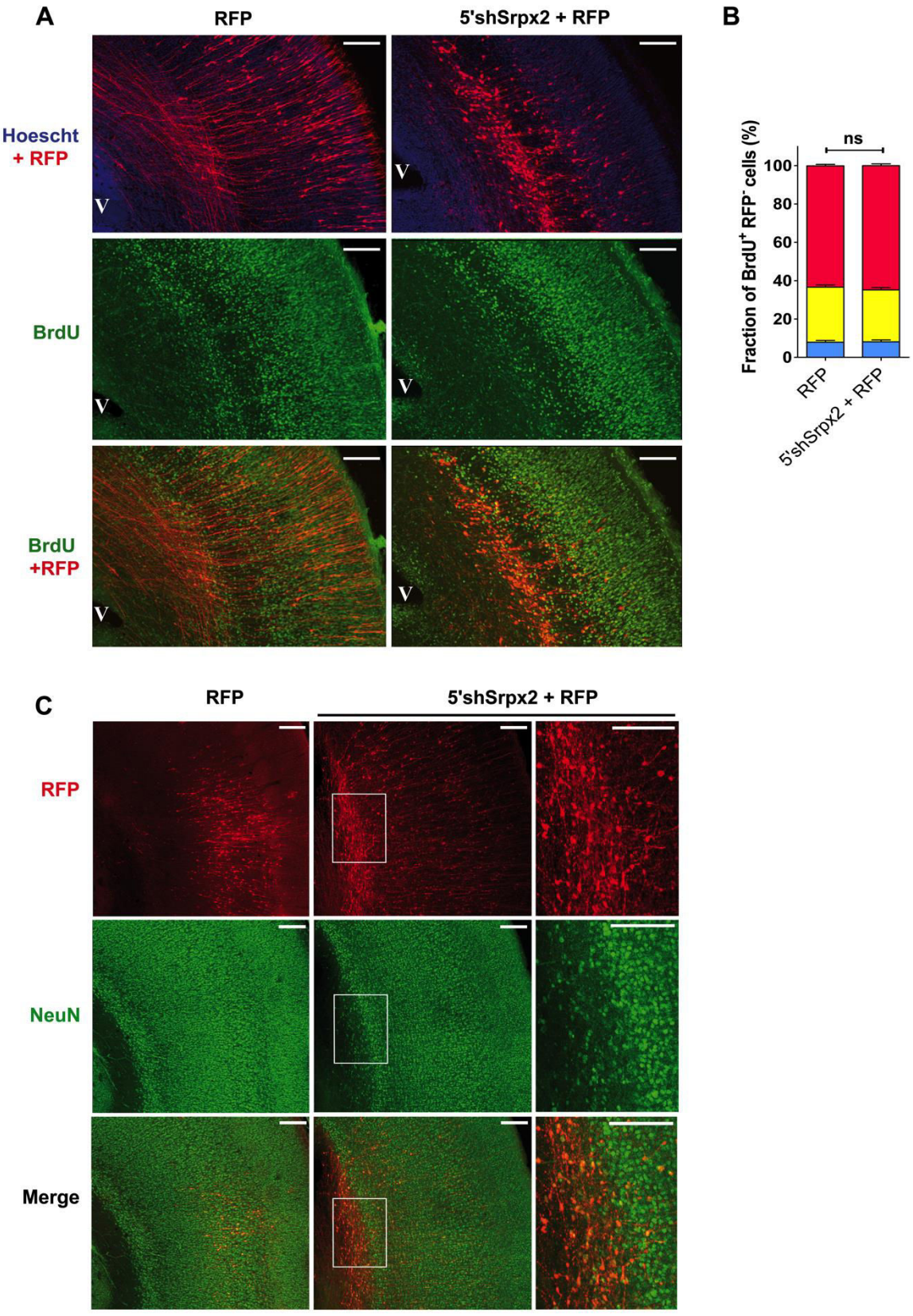
Supplementary Figure 4. *In utero Srpx2* knock-down in electroporated cells has no major effect on the migration of neighbouring wild-type cells.

(A) Wild type neurons born in the same period as the neurons electroporated with control plasmid (RFP) or with silencing *Srpx2* construct (5'shSrpx2 + RFP) at E15 were labelled with BrdU injected intraperitoneally at the time of electroporation. V: ventricle. Coronal sections at E20, fluorescence microscopy with ApoTome attachment. White bar: 200 µm.

(B) At E20, the population of BrdU+, RFP- cells did not show any significant change in distribution ($p > 0.05$, Mann Whitney test, two-tailed) (Supplementary Table 1), as quantified according to automated subdivision into five regions of equal length, from ventricle (V) to the surface, as described previously (Elias *et al.*, 2007) and as also shown in Fig. 2. Values represent mean ± s.e.m. from three independent experiments. Ventricular/subventricular zones: blue color; intermediate zone: yellow; cortical plate: red.

(C) Presence of ectopic neurons at postnatal stage P7.

NeuN immunolabeling (green) of neuronal cells on coronal sections of P7 rat brains electroporated in control (RFP) and in silencing (5'shSrpx2+RFP) conditions. White bar: 200 µm.


A
RFP
5'shSrpx2 + RFP
Hoescht
+ RFP
BrdU
BrdU
+RFP
V
B
ns
Fraction of BrdU+ RFP- cells (%)
100
80
60
40
20
0
RFP
5'shSrpx2 + RFP
C
RFP
5'shSrpx2 + RFP
RFP
NeuN
Merge

Supplementary Figure 5. *Srpx2* silencing does neither lead to change in cell cycle parameters of neural progenitors nor to altered radial glia scaffold.

Electroporation with control plasmid (RFP, red) or with silencing *Srpx2* construct (5'shSrpx2 + RFP) were performed at embryonic day 15 (E15).

(A-C) Analysis of cell cycle parameters.

(A) The fraction of cells electroporated at E15 (RFP+) that also showed expression of the cell cycle marker Ki67 (green) as detected by immunohistochemistry at E17, was not different between the control (RFP) and the *Srpx2* silencing (5'shSrpx2 + RFP) conditions.

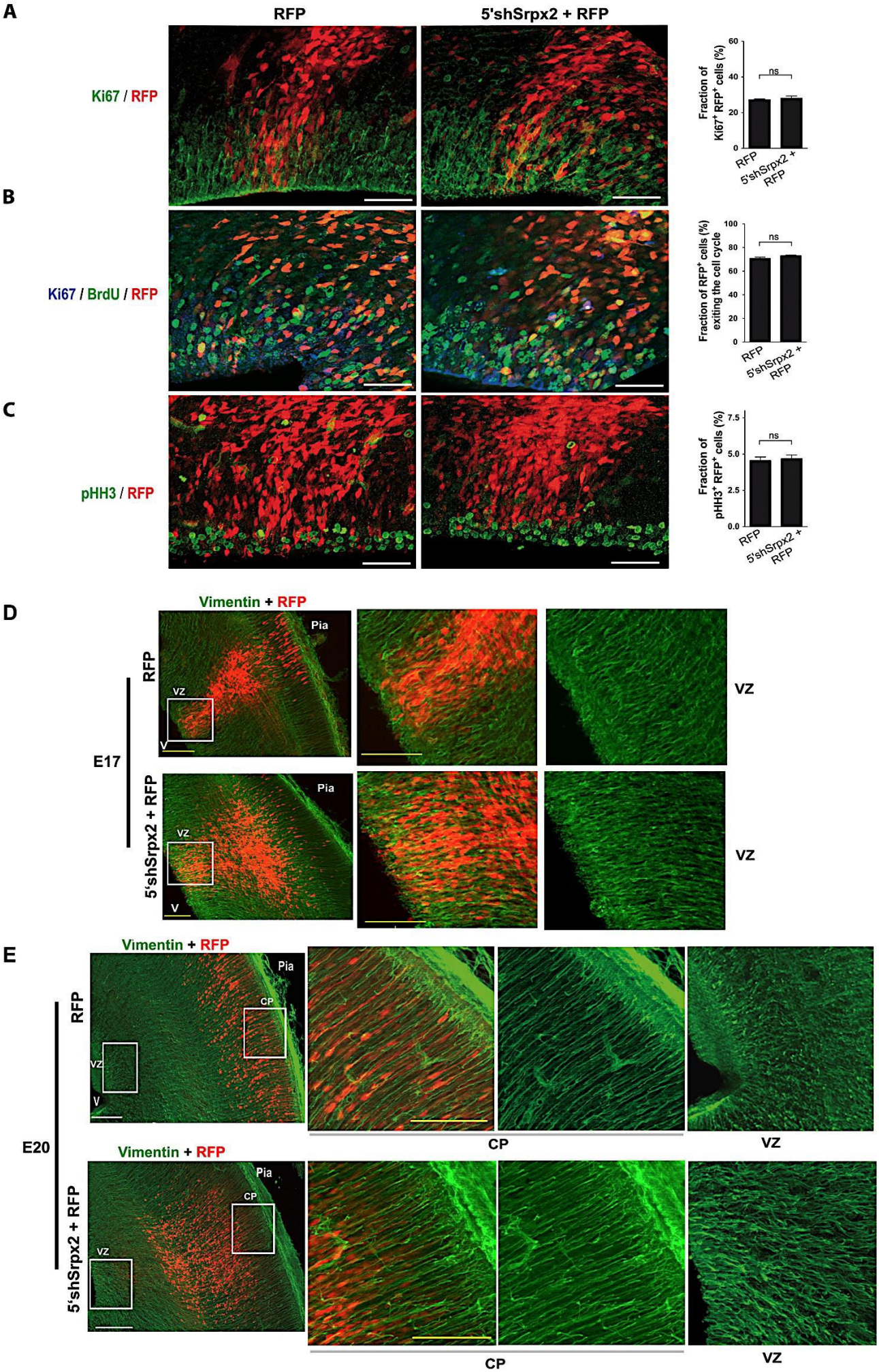
(B) BrdU pulse was administrated 24 h. later and the brains analyzed at E17. BrdU (green) and Ki67 (blue) were detected by immunohistochemistry. There was no difference in the proportion of electroporated cells (RFP+) that were in the cell cycle and that have now exited it (BrdU+, Ki67-), between the control and the silencing conditions.

(C) At E17, the fraction of cells electroporated at E15 (RFP+) that also showed expression of the cell cycle M-phase marker pHH3 (phosphorylated histone 3; green) as detected by immunohistochemistry, was not different between the control and the silencing conditions. Coronal sections, fluorescence microscopy with ApoTome attachment.

For all comparisons mentioned above (A-C), $p > 0.05$ (Mann Whitney test, two-tailed) (Supplementary Table 1). Values represent mean ± s.e.m. from six to nine independent experiments. White bar: 20 µm.

(D-E) Analysis of radial glia scaffold.

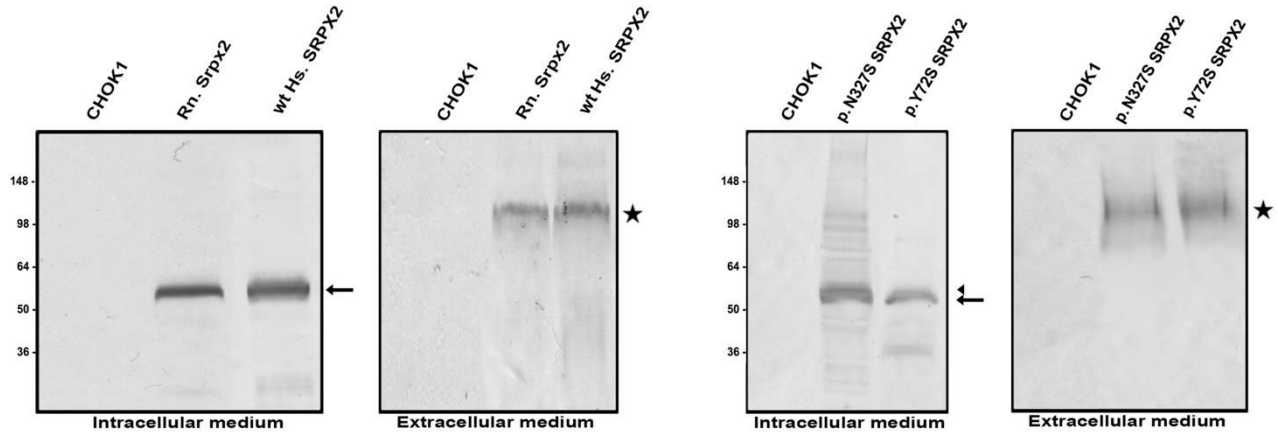
Cells were electroporated (red) with control plasmid (RFP) or with silencing *Srpx2* construct (5'shSrpx2 + RFP) at embryonic day 15 (E15) and the radial glial cells immunolabelled with anti-Vimentin antibody (green) at (D) embryonic day 17 (E17) and (E) at E20. Close-up pictures are shown on right sides. No gross alteration in the radial glia scaffolding was observed. V: ventricle. VZ: ventricular zone. CP: cortical plate. Coronal sections, fluorescence microscopy with ApoTome attachment. Yellow bar: 100 µm. White bar: 200 µm.


A
RFP
5'shSrpx2 + RFP
Ki67 / RFP
Fraction of Ki67+ RFP+ cells (%)
ns
RFP
5'shSrpx2 + RFP
B
Ki67 / BrdU / RFP
Fraction of RFP+ cells (%) exiting the cell cycle
ns
RFP
5'shSrpx2 + RFP
C
pHH3 / RFP
Fraction of pHH3+ RFP+ cells (%)
ns
RFP
5'shSrpx2 + RFP
D
Vimentin + RFP
RFP
E17
5'shSrpx2 + RFP
Pia
VZ
V
VZ
E
Vimentin + RFP
RFP
E20
5'shSrpx2 + RFP
Pia
CP
VZ
V
CP
VZ

Supplementary Figure 6. Production of rat Srpx2 and of human SRPX2 in the extracellular milieu of stably-transfected CHO cells.

In the cell lysates (left), rat Srpx2 or human SRPX2 proteins were revealed as ≅50 kDa monomeric bands (arrow) (see also Supplementary Fig.2D). Of note, a double band (arrowhead) was obtained for the production of p.N327S SRPX2 mutant protein, as expected from its previously reported partial N-glycosylation (Roll *et al.*, 2006). In the extracellular milieu (right), only the previously reported ≅100 kDa forms (Tanaka *et al.*, 2009) were seen (asterisk).

Supplementary methods. Stably transfected Chinese hamster ovary (CHO-K1, ATCC) cell lines for expression of wild-type rat Srpx2 or wild-type or mutant (p.Y72S or p.N327S) human SRPX2 proteins were established and selected. Production and secretion of the rat Srpx2 and human SRPX2 proteins were estimated by western blotting of proteins from the cell lysates and from the culture medium, respectively. Extracellular SRPX2 proteins were recovered from cells grown 48h. in Optimem (Life technologies).



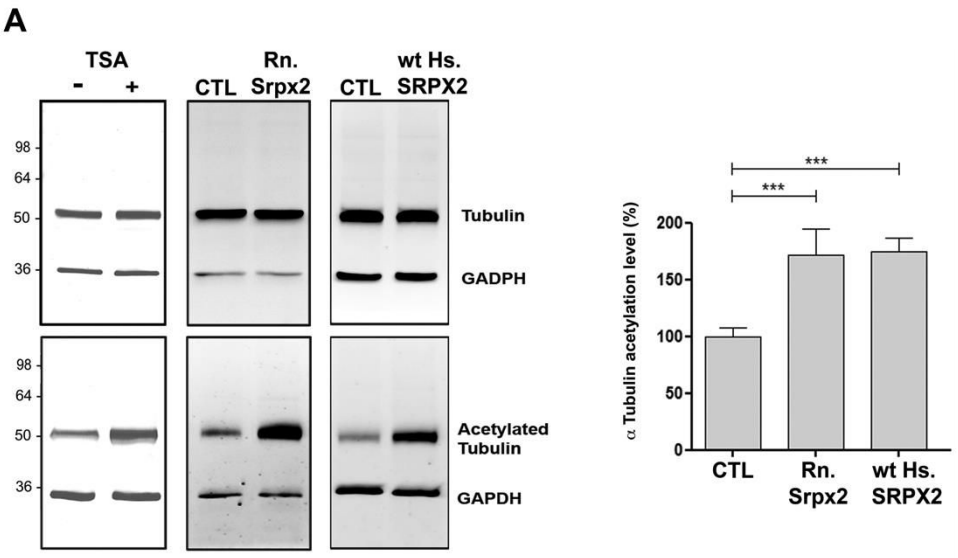
Supplementary Figure 7. SRPX2 influences acetylation of alpha-tubulin in various cell types *in vitro*.

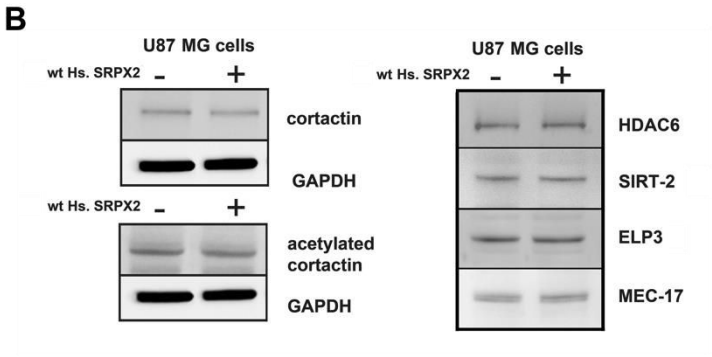
(A) SRPX2 increases acetylation of alpha-tubulin in HEK293 cells. The relative level of acetylated alpha-tubulin versus total alpha-tubulin increased in the presence of wild-type rat Srpx2 and human SRPX2 proteins. Expression levels were estimated by western blot scanning and as compared with control conditions (CTL) set to 100%. GAPDH expression levels were used on each western blot for respective normalizations. Total tubulin, acetylated tubulin and GAPDH were detected with the appropriate antibodies (Supplementary Table 3). TSA: trichostatin A (0.5 µM; nonselective HDAC inhibitor, positive control). Values ± s.e.m. represent the mean of at least seven independent experiments. Kruskall-Wallis test followed by Mann Whitney test, two-tailed, with Bonferroni correction (Supplementary Table 1).

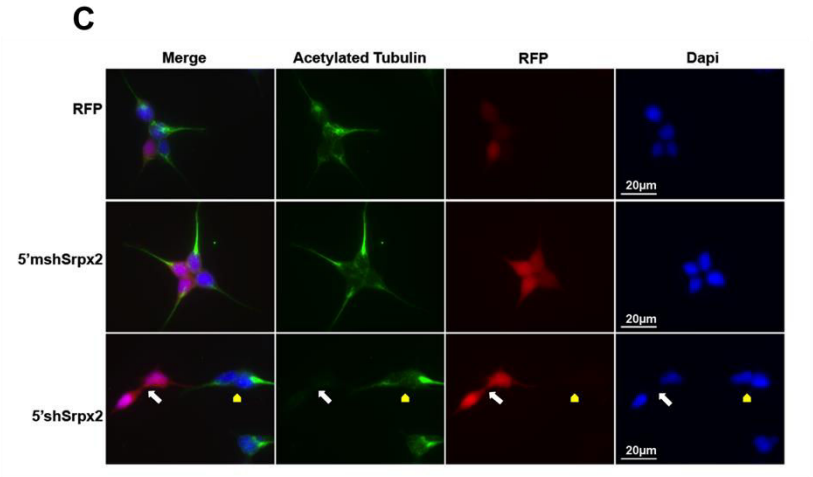
(B) Human wild-type SRPX2 (Hs. SRPX2) does neither lead to increased levels of cortactin acetylation (left), nor to quantitative changes in the expression of deacetylases HDAC6 and SIRT2 and of acetyltransferases ELP3 and MEC17 (right).

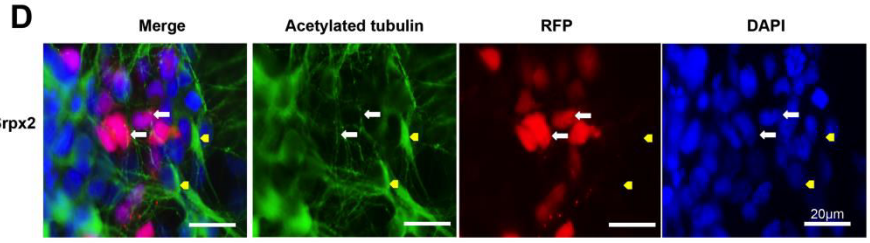
(C) *Srpx2* silencing (5'shSrpx2) leads to decreased expression of acetylated alpha-tubulin in transiently tranfected AR42J cells (white arrow); note that neighboring non-transfected cells show regular expression of acetylated alpha-tubulin (yellow arrowhead). Mismatch construct (5'mshSrpx2) has no effect. RFP (red): control condition. DAPI: blue staining.

(D) Decreased alpha-tubulin acetylation (green) in primary neuronal cells derived from 5'shSrpx2-electroporated neurons (red) (white arrows), as compared with neighboring non-electroporated cells (yellow arrowheads). DAPI: blue staining.


A
TSA
- +
Rn.
CTL Srpx2
wt Hs.
CTL SRPX2
98
64
50
36
Tubulin
GADPH
Acetylated
Tubulin
GAPDH
α Tubulin acetylation level (%)
200
150
100
50
0
***
***
CTL
Rn.
Srpx2
wt Hs.
SRPX2


B
U87 MG cells
wt Hs. SRPX2 - +
cortactin
GAPDH
wt Hs. SRPX2 - +
acetylated
cortactin
GAPDH
U87 MG cells
wt Hs. SRPX2 - +
HDAC6
SIRT-2
ELP3
MEC-17

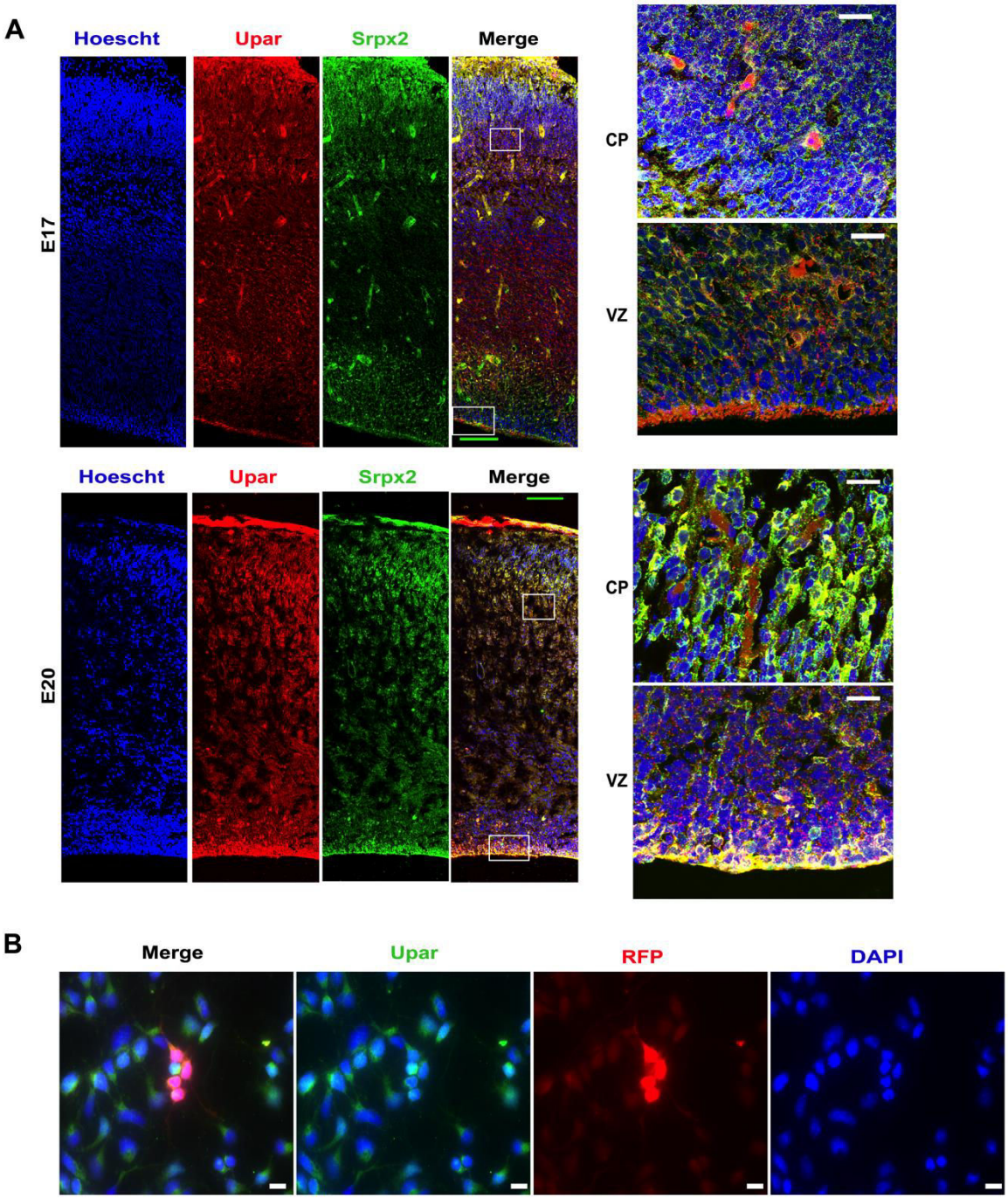

C
Merge
Acetylated Tubulin
RFP
Dapi
RFP
5'mshSrpx2
5'shSrpx2
20μm
20μm
20μm


D
Merge
Acetylated tubulin
RFP
DAPI
5'shSrpx2
20μm

Supplementary Figure 8. The plasminogen activator receptor of the urokinase-type (Upar) is expressed in the developing rat cerebral cortex.

(A) Upar is expressed *in vivo* in the developing cerebral cortex, notably in Srpx2 positive cells. CP: cortical plate. VZ: ventricular zone. Upar protein was detected using goat anti-Upar antibody (Suppl. Table 3). Fluorescence microscopy with ApoTome attachment or (close-up picture) confocal microscopy. Green bars: 100 µm; white bars: 20 µm.

(B) Upar is expressed in primary neuronal cells *in vitro* prepared from the cortex of 16-days-old Wistar rat embryos (E16) electroporated at E15 with RFP construct. Upar protein was detected (green) in electroporated (red) and non-electroporated cells using mouse anti-Upar antibody (Suppl. Table 3). Nuclei are stained with DAPI (blue). Fluorescence microscopy with ApoTome attachment. White bars: 10 µm.


A
Hoescht
Upar
Srpx2
Merge
E17
CP
VZ
Hoescht
Upar
Srpx2
Merge
E20
CP
VZ
B
Merge
Upar
RFP
DAPI

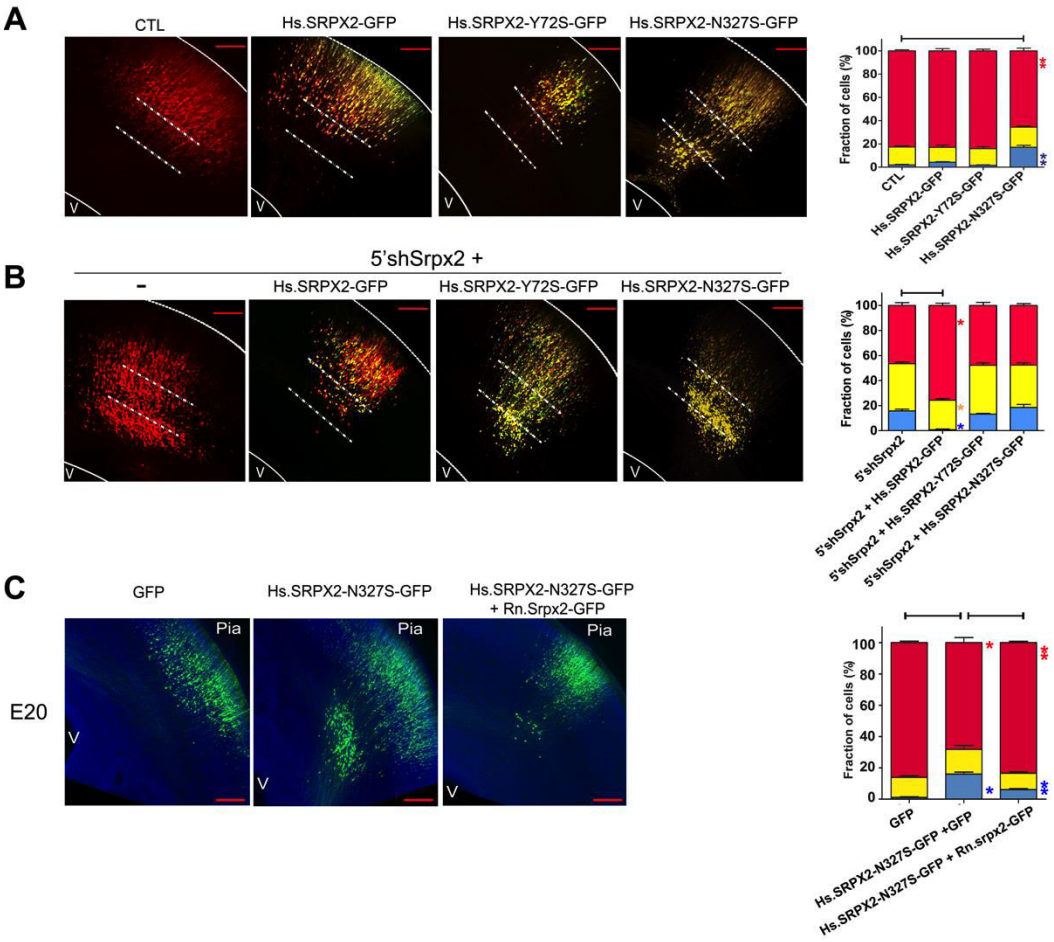
Supplementary Figure 9. *In vivo* analyzes of the human SRPX2 mutant proteins.

(A) Expression experiments. Distribution of cells at E20 five days after *in utero* electroporation of either expression construct. Expression of wild-type human Hs.SRPX2-GFP, and of mutant human Hs.SRPX2-Y72S-GFP, had no effect whereas mutant human Hs.SRPX2-N327S-GFP led to impaired cell distribution that persisted after birth (data not shown). GFP: green fluorescent protein. CTL (RFP, red fluorescent protein): control electroporation condition. Values represent mean ± s.e.m. from three to 12 independent experiments.

(B) Reexpression-based rescue experiments. Distribution of cells at E20 five days after *in utero* co-electroporation of 5'shSrpx2 with either of expression construct. Hs.SRPX2-GFP, but neither of Hs.SRPX2-Y72S-GFP or Hs.SRPX2-N327S-GFP, significantly rescued the cell distribution defect. Values represent mean ± s.e.m. from three to eight independent experiments.

(C) The phenotype caused by mutant p.N327S-SRPX2 protein expression was attenuated by competitive overexpression of rat Srpx2 protein (Rn.Srpx2-GFP). The dominant-negative effect of the p.N327S mutation was tested by co-electroporation of the recombinant pCAGIG-based constructs for the concomitant expression of rat Srpx2 and human mutant p.N327S SRPX2 proteins, as compared with co-electroporation with the non-recombinant construct pCAGIG and the pCAGIG-based construct for p.N327S SRPX2 expression. Of note, two further wild-type human SRPX2 constructs also led to successful rescues (data not shown). Hoescht: blue staining. V: ventricle. Values represent mean ± s.e.m. from five to seven independent experiments.

Red bar: 150 µm. Statistics: Kruskall-Wallis test followed by Mann Whitney test, two-tailed, with Bonferroni correction. For convenience, not all statistical comparisons are shown (Supplementary Table 1).


A
CTL
Hs.SRPX2-GFP
Hs.SRPX2-Y72S-GFP
Hs.SRPX2-N327S-GFP
V
Fraction of cells (%)
CTL
Hs.SRPX2-GFP
Hs.SRPX2-Y72S-GFP
Hs.SRPX2-N327S-GFP
B
5'shSrpx2 +
-
Hs.SRPX2-GFP
Hs.SRPX2-Y72S-GFP
Hs.SRPX2-N327S-GFP
Fraction of cells (%)
5'shSrpx2
5'shSrpx2 + Hs.SRPX2-GFP
5'shSrpx2 + Hs.SRPX2-Y72S-GFP
5'shSrpx2 + Hs.SRPX2-N327S-GFP
C
E20
GFP
Hs.SRPX2-N327S-GFP
Hs.SRPX2-N327S-GFP
+ Rn.Srpx2-GFP
Pia
V
Fraction of cells (%)
GFP
Hs.SRPX2-N327S-GFP +GFP
Hs.SRPX2-N327S-GFP + Rn.srpx2-GFP

Supplementary Figure 10. Tubacin is detected into the embryonic brains and leads to significant increase in alpha-tubulin acetylation levels.

(A-C) Multiple reaction monitoring (MRM) of tubacin in embryonic brain extracts. The actual delivery of tubacin into the brains of E17 embryos was investigated after cessation of short intraperitoneal administration to naive pregnant rats. Controls consisted in DMSO (the vehicle) administration following the same procedure. MRM analysis was conducted on a Fast LC-MS/MS platform combining UHPLC Nexera and the tandem MS model LCMS-8030 (Shimadzu).

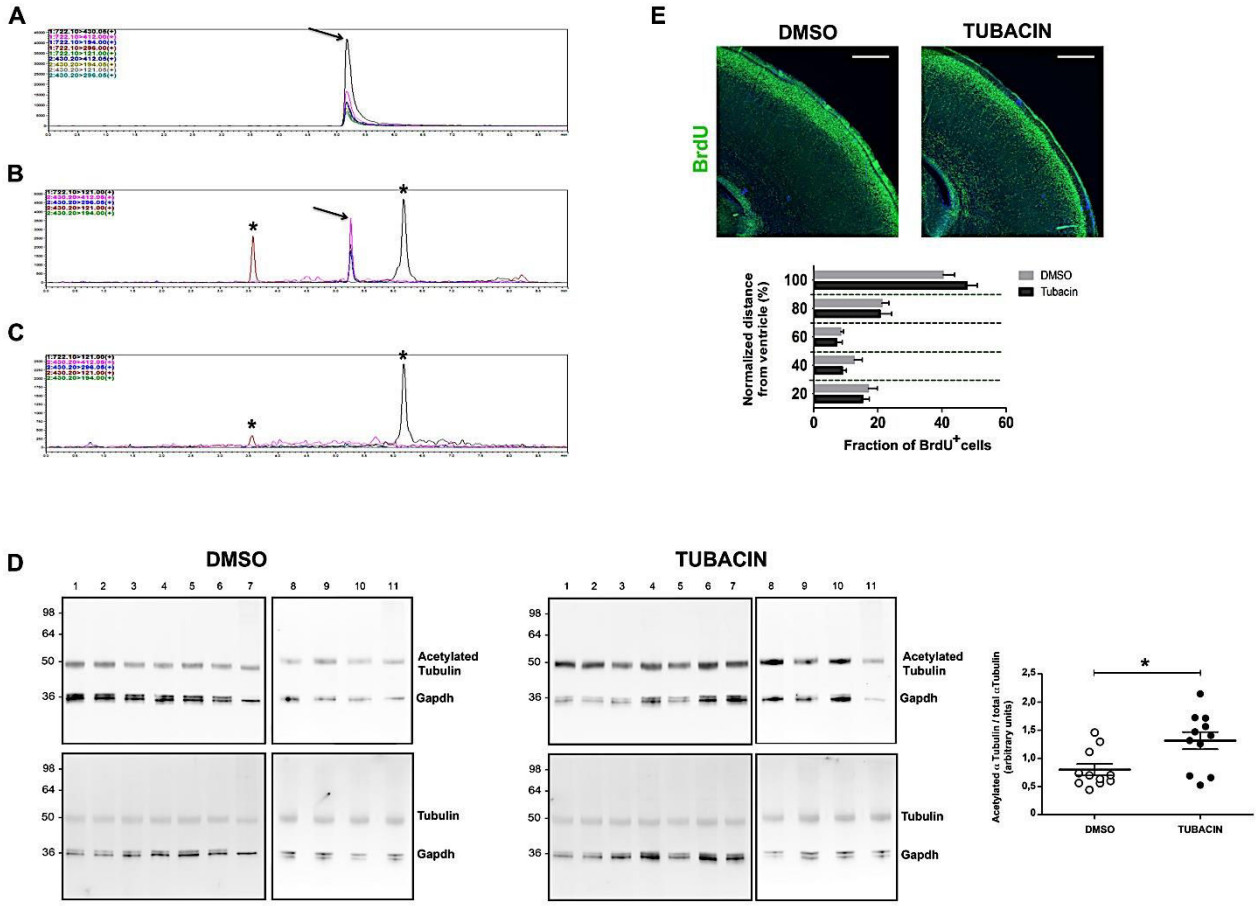
(A) MRM optimization. Tubacin detection was optimized by successive injections of tubacin standard (1 ng) without analytical column, and using the optimization method of the LabSolution software of the triple quadripole 8030. Optimization of tubacin fragmentation showed two parent pseudo-molecular ions at 722.1 Da and 430.2 Da, respectively. The latter (430.2 Da) originated from in-source fragmentation of tubacin during electrospray ionization. After optimisation, the two parent ions yielded the same fragment ions: 722.1>430.05; 722.1>412.0; 722.1>296.0; 722.1>194.0; 722.1>121.0 for the first parent ion, and 430.2>412.05; 430.2>296.05; 430.2>194.05; 430.2>121.05 for the second parent ion. Tubacin standard was then injected on a reverse phase column (100x2 mm NUCLEODUR Isis 1.8µm, Macherey Nagel) and eluted by a linear gradient (50 to 90% acetonitrile, 5 mM ammonium acetate) from the column with a retention time of 5.2 min (arrow).

(B) The peaks (arrow) corresponding to the four fragment ions of tubacin parent ion 430.2 (412.05, 296.05, 194.0, 121.0) were detected in all embryonic brain extracts (n = 7) after maternal tubacin treatment. The 722.1 parent ion was not detected, indicating possible natural fragmentation processing *in vivo*. *: those non-specific transitions (722.1>121.0 and 430.2>121.0, respectively) had different retention times from tubacin fragment ions and are unrelated with tubacin fragmentation.

(C) No tubacin fragment ion was detected (arrow) after maternal DMSO administration. *: non-specific transitions (see above). The detection of tubacin fragment ions in all tubacin-treated embryos (n = 7) (see b) as compared with the absence of tubacin fragment in any DMSO-treated embryo (n = 6), yielded significant statistics (Fisher's exact test, two-tailed: p = 0.00058) (Supplementary Table 1).

(D) Tubacin administration during pregnancy significantly increased alpha-tubulin acetylation levels in E17 embryonic brains (n = 11), as compared with the administration of the vehicle (DMSO) (n = 11). Mann-Whitney test, two-tailed (Supplementary Table 1).

(E) Tubacin administration during pregnancy at E16 and E17 has no major effect on the postnatal (P7) positioning of late migrating neurons. Tubacin or the vehicle only (DMSO) (see Material and Methods) was injected at E16 and E17. Neurons were labelled with BrdU injected intraperitoneally 1h. after the second tubacin injection. BrdU positive cells were counted by a specific plugin of ImageJ (F. Cordelières, Institut Curie, France). Histograms represent the fraction of BrdU positive cells in five regions of equal length, from the ventricle to the pia (normalized as a percentage). n = 5 embryos in each condition. No significant difference in the distribution of BrdU positive cells was observed (Mann Whitney test, two-tailed). Coronal sections, fluorescence microscopy with ApoTome attachment. White bar: 500 µm.


A
B
C
E
DMSO
TUBACIN
BrdU
Normalized distance from ventricle (%)
100
80
60
40
20
0
20
40
60
DMSO
Tubacin
Fraction of BrdU+cells
D
DMSO
TUBACIN
1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11
98
64
50
36
Acetylated Tubulin
Gapdh
Tubulin
Gapdh
Acetylated α Tubulin / total α Tubulin (arbitrary units)
2,5
2,0
1,5
1,0
0,5
0
*
DMSO
TUBACIN

Supplementary Figure 11. Srpx2 silencing *in utero* leads to postnatal epileptic manifestations.

(A) The presence in the *corpus callosum* (CC) of ectopic projection neurons at postnatal day 14 (P14) was verified in *Srpx2*-silenced rats, whereas control electroporated rats (RFP) showed regular position of projection neurons in the cortex (Cx). Hoescht: blue staining.

(B) Susceptibility to pentylenetetrazole (PTZ)-induced seizures.

The rats that had been subjected to *Srpx2* silencing *in utero*, showed higher risk to PTZ-induced GTCS with statistical significance, as compared to naive (non-electroporated) animals and to control electroporation (RFP plasmid) conditions. No statistically significant difference in weight or sex-ratio was found between the three groups of naive, control-electroporated and shRNA-electroporated rats (data not shown). The number of rats without (Supplementary Movie 3) and with (Supplementary Movie 4) GTCS is indicated. Fisher's exact test, two-tailed (Supplementary Table 1).

(C-G) Diffused epileptiform activity in *Srpx2*-silenced P14 rat is rescued by tubacin.

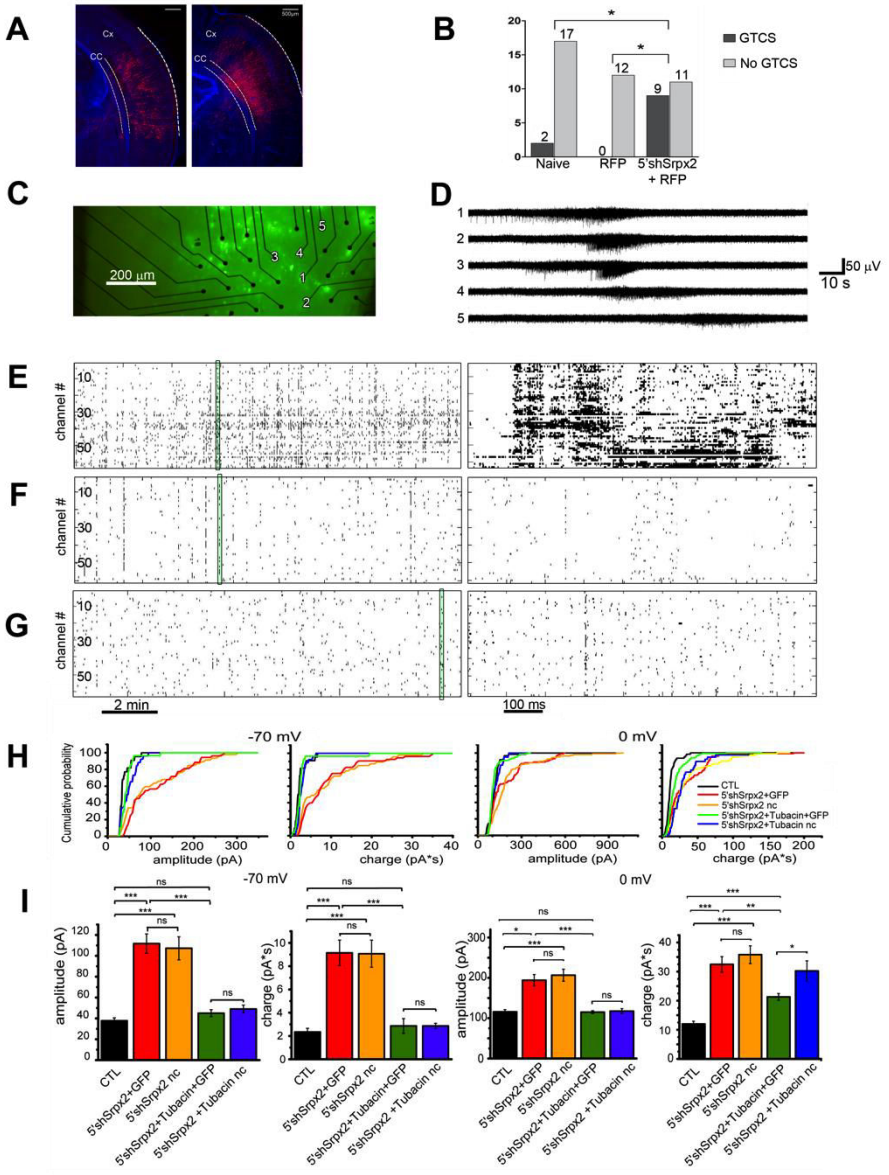
(C) Electroporated cortical slice over a multichannel array MEA500/30iR-Ti-gr is shown.

(D) Representative traces of seizure-like activity recorded from five channels as indicated in (C).

(E-G) Raster plot of the spontaneous activity in brain slices from *Srpx2*-silenced (E), control (F), and tubacin treated *Srpx2*-silenced (G) P14 rats. Each vertical bar represents a spike detected by one microelectrode of the array. On the right the area outlined by the green box (on the left), is shown in expanded time scale. Note the increased synchronized activity in *Srpx2* silencing condition.

(H) Cumulative probability of maximal amplitudes and charge transfer (charge) of individual sEPSCs (-70 mV) and sIPSCs (0 mV) bursts recorded in brain slices from control, *Srpx2*-silenced, and tubacin treated *Srpx2*-silenced rats. For *Srpx2*-silenced, and tubacin treated *Srpx2*-silenced conditions data from electroporated (+GFP) and neighboring non-electroporated (nc) cells are shown separately.

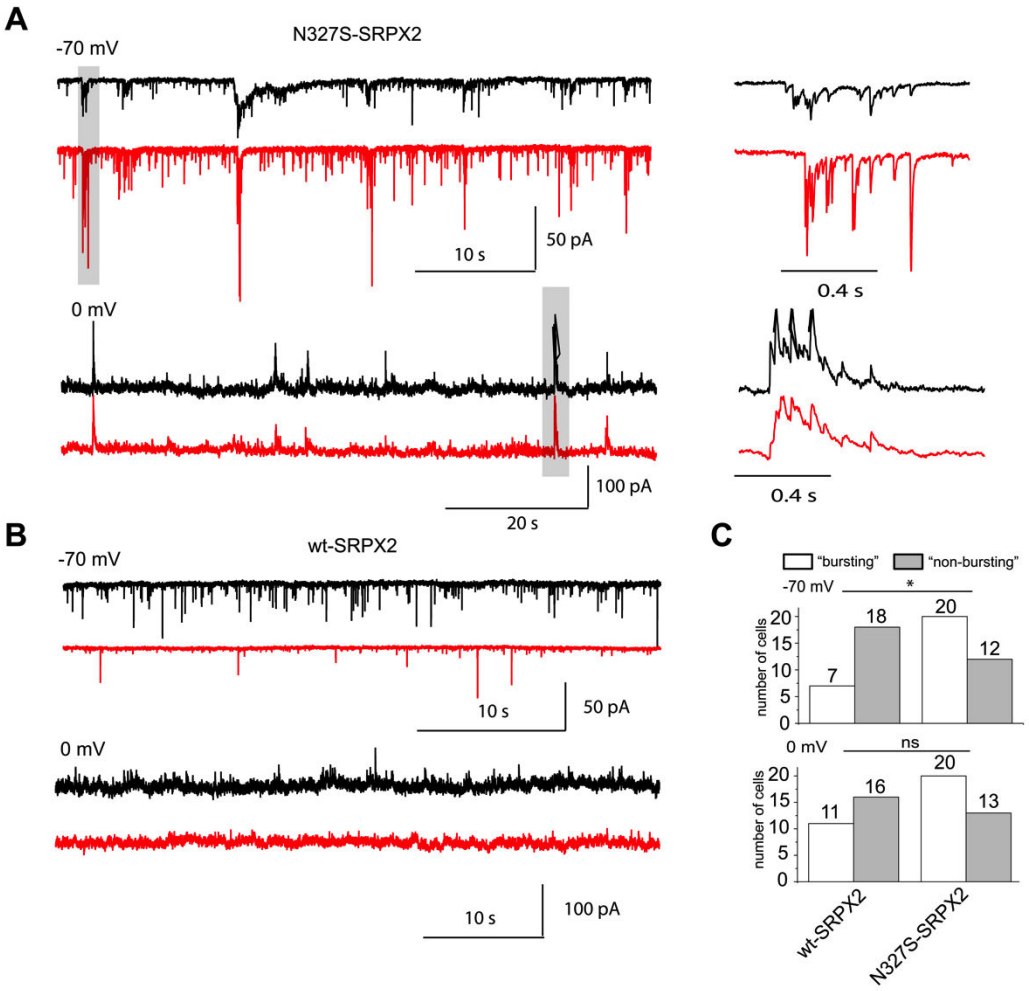
(I) Average values of maximal amplitudes and charge transfer (charge) of sEPSCs (-70 mV) and sIPSCs (0 mV) bursts recorded in brain slices from control, *Srpx2*-silenced, and tubacin treated *Srpx2*-silenced rats. For *Srpx2*-silenced, and tubacin treated *Srpx2*-silenced conditions data from electroporated (+GFP) and neighboring non-electroporated (nc) cells are shown separately. Of note, +GFP and nc cells did not show differences after tubacin treatment except for charge transfer of sIPSCs. Statistics: Kruskall-Wallis test, post-hoc Dunn's multiple comparison test (Supplementary Table 1).


A
Cx
CC
B
GTCS
No GTCS
Naive
RFP
5'shSrpx2 + RFP
C
200 µm
D
50 µV
10 s
E
F
G
channel #
2 min
100 ms
H
-70 mV
0 mV
Cumulative probability
amplitude (pA)
charge (pA*s)
CTL
5'shSrpx2+GFP
5'shSrpx2 nc
5'shSrpx2+Tubacin+GFP
5'shSrpx2+Tubacin nc
I
-70 mV
0 mV
amplitude (pA)
charge (pA*s)

Supplementary Figure 12. Overexpression of mutant p.N327S-SRPX2 protein *in utero* leads to increased spontaneous bursting activity in neocortical slices.

(A,B) Representative traces of glutamatergic and GABAergic spontaneous activities recorded at membrane potentials -70 mV (spontaneous excitatory postsynaptic current, sEPSC) and 0 mV (spontaneous inhibitory postsynaptic current, sIPSC), respectively, from electroporated (red) and neighboring non-electroporated (black) neurons with (A), mutant p.N327S-SRPX2 and (B), wt-SRPX2 proteins. In (A) individual bursts (highlighted, grey boxes) are shown on the right at extended time scale. Recordings were made simultaneously from two neurons. Note that some bursts are synchronized between two cells. mV: millivolt. pA: picoampere.

(C) Significant increase in the number of bursting neurons at membrane potentials -70 mV (sEPSCs) is caused by *in utero* electroporation of construct for p.N327S-SRPX2 mutant expression, as compared with electroporation of the construct for wild-type SRPX2. The numbers of neurons with sEPSCs (top) and sIPSCs (bottom) interictal-like bursts are presented. Fisher's exact test, two-tailed, Bonferroni correction.



Supplementary Table 1. Overview of statistical data.

Figure	Statistical test and p value	"n" per condition
2B	Kruskal-Wallis test, p < 0.0001	4-8
	Mann Whitney test, two-tailed	
	Bonferroni correction; ns p > 0.00625 *p < 0.00625 **p < 0.00125 ***p < 0.000125	
CP	RFP vs mU6pro, p=0.9333 ns	
	RFP vs 5'm3shSrpx2, p=0.0727 ns	
	RFP vs 3'm3shSrpx2, p=0.7619 ns	
	RFP vs Rn.Srpx2-GFP, p=0.6286 ns	
	5'shSrpx2 vs 5'm3shSrpx2, p=0.0006 **	
	3'shSrpx2 vs 3'm3shSrpx2, p=0.0022 *	
	5'shSrpx2 vs 3'shSrpx2, p=0.366 ns	
	5'shSrpx2 vs 5'shSrpx2 + Rn.Srpx2-GFP, p=0.0025 *	
	Kruskal-Wallis test, p < 0.0001	
	Mann Whitney test, two-tailed	
	Bonferroni correction; ns p > 0.00625 *p < 0.00625 **p < 0.00125 ***p < 0.000125	
IZ	RFP vs mU6pro, p=0.5697 ns	
	RFP vs 5'm3shSrpx2, p=0.3152 ns	
	RFP vs 3'm3shSrpx2, p=0.99 ns	
	RFP vs Rn.Srpx2-GFP, p=0.6286 ns	
	5'shSrpx2 vs 5'm3shSrpx2, p=0.0006 **	
	3'shSrpx2 vs 3'm3shSrpx2, p=0.0022 *	
	5'shSrpx2 vs 3'shSrpx2, p=0.4452 ns	
	5'shSrpx2 vs 5'shSrpx2 + Rn.Srpx2-GFP, p=0.0025 *	
	Kruskal-Wallis test, p < 0.0001	
	Mann Whitney test, two-tailed	
	Bonferroni correction; ns p > 0.00625 *p < 0.00625 **p < 0.00125 ***p < 0.000125	
VZ/SVZ	RFP vs mU6pro, p=0.0283 ns	
	RFP vs 5'm3shSrpx2, p=0.0121 ns	
	RFP vs 3'm3shSrpx2, p=0.1714 ns	
	RFP vs Rn.Srpx2-GFP, p=0.8571 ns	
	5'shSrpx2 vs 5'm3shSrpx2, p=0.0006 **	
	3'shSrpx2 vs 3'm3shSrpx2, p=0.0022 *	
	5'shSrpx2 vs 3'shSrpx2, p=0.7308 ns	
	5'shSrpx2 vs 5'shSrpx2 + Rn.Srpx2-GFP, p=0.0025 *	
3A	Mann Whitney test, two-tailed	25
	GFP vs 5'shSrpx2, p=0.0002 (p < 0.001 ***)	
3C	Fisher's exact test, two-tailed, p < 0.0001	159-161
	Bonferroni correction; ns p > 0.0167 *p < 0.0167 **p < 0.0033 ***p < 0.00033	
	RFP s1 vs 5'shSrpx2 s2, p=0.1273 ns	
	RFP s1 vs 5'shSrpx2 s3, p < 0.001 **	
	5'shSrpx2 s2 vs 5'shSrpx2 s3 , p < 0.00001 ***	

4B		Kruskal-Wallis test, p < 0.0001	6-43
		Mann Whitney test, two-tailed	
		Bonferroni correction; ns p > 0.007 *p < 0.007 **p < 0.0014 ***p < 0.00014	
	CHO-K1	CTL vs TSA, p < 0.0001 ***	
		CTL vs Rn.Srpx2, p < 0.0001 ***	
		CTL vs Hs.SRPX2, p < 0.0001 ***	
		CTL vs Hs.N327S SRPX2, p=0.9556 ns	
		CTL vs Hs.Y72S SRPX2, p= 0.008 ns	
		Hs.SRPX2 vs Hs.N327S SRPX2, p < 0.0001 ***	
		Hs.SRPX2 vs Hs.Y72S SRPX2, p < 0.0001 ***	
4C		Kruskal-Wallis test, p < 0.0001	9-22
		Mann Whitney test, two-tailed	
		Bonferroni correction; ns p > 0.01 *p < 0.01 **p < 0.002 ***p < 0.0002	
	U87MG	CTL vs Hs.SRPX2, p < 0.0001 ***	
		CTL vs Hs.N327S SRPX2, p=0.0059 *	
		CTL vs Hs.Y72S SRPX2, p=0.0108 ns	
		Hs.SRPX2 vs Hs.N327S SRPX2, p=0.0008 **	
		Hs.SRPX2 vs Hs.Y72S SRPX2, p=0.0018 ns	
4D		Mann Whitney test, two-tailed; ns p > 0.05 *p < 0.05 **p < 0.01 ***p < 0.001	8
		5'shSrpx2 vs RFP, p < 0.001 ***	
4E		Mann Whitney test, two-tailed; ns p > 0.05 *p < 0.05 **p < 0.01 ***p < 0.001	8
		sh-CTL vs shCTL + SRPX2, p=0.038, *	
		sh-PLAUR vs shPLAUR + SRPX2, p=0.50 ns	
5A		Mann Whitney test, two-tailed; ns p > 0.05 *p < 0.05 **p < 0.01 ***p < 0.001	6
	CP	5'shSrpx2 vs 5'shSrpx2 + Rn.Mec17, p=0.015 *	
	IZ	5'shSrpx2 vs 5'shSrpx2 + Rn.Mec17, p=0.09 ns	
	VZ/SVZ	5'shSrpx2 vs 5'shSrpx2 + Rn.Mec17, p=0.006 **	
5B		Mann Whitney test, two-tailed; ns p > 0.05 *p < 0.05 **p < 0.01 ***p < 0.001	12-14
	R5	5'shSrpx2+ Niltubacin vs 5'shSrpx2 +Tubacin, p=0.0006 ***	
	R4	5'shSrpx2+ Niltubacin vs 5'shSrpx2 +Tubacin, p=0.0031 **	
	R3	5'shSrpx2+ Niltubacin vs 5'shSrpx2 +Tubacin, p=0.7381 ns	
	R2	5'shSrpx2+ Niltubacin vs 5'shSrpx2 +Tubacin, p=0.0168 *	
	R1	5'shSrpx2+ Niltubacin vs 5'shSrpx2 +Tubacin, p=0.0168 *	
5C		Kruskal-Wallis test, p=0.0001	4-19
		Mann Whitney test, two-tailed	
		Bonferroni correction; ns p > 0.0167 *p < 0.0167 **p < 0.0033 ***p < 0.00033	
	CP	5'shSrpx2 vs 5'shSrpx2 + DMSO, p=0.1135 ns	
		CTL vs 5'shSrpx2 + Tubacin, p=0.1255 ns	
		5'shSrpx2 + DMSO vs 5'shSrpx2 + Tubacin , p=0.0003 ***	
		Kruskal-Wallis test, p < 0.0001	
		Mann Whitney test, two-tailed	
		Bonferroni correction; ns p > 0.0167 *p < 0.0167 **p < 0.0033 ***p < 0.00033	
	IZ	5'shSrpx2 vs 5'shSrpx2 + DMSO, p=0.3746 ns	

	CTL vs 5'shSrpx2 + Tubacin, p=0.2316 ns 5'shSrpx2 + DMSO vs 5'shSrpx2 + Tubacin , p < 0.0001 ***	
VZ/SVZ	Kruskal-Wallis test, p=0.0006 Mann Whitney test, two-tailed Bonferroni correction; ns p > 0.0167 *p < 0.0167 **p < 0.0033 ***p < 0.00033 5'shSrpx2 vs 5'shSrpx2 + DMSO, p=0.0969 ns CTL vs 5'shSrpx2 + Tubacin, p=0.0187 ns 5'shSrpx2 + DMSO vs 5'shSrpx2 + Tubacin p=0.0015 **	
5D	Fisher's exact test, two-tailed; ns p > 0.05 *p < 0.05 **p < 0.01 ***p < 0.001 5'shSrpx2 + DMSO vs 5'shSrpx2 + Tubacin, p=0.000016 ***	12-19
6A	Kruskal-Wallis test, p = 0.0002 Mann Whitney test, two-tailed Bonferroni correction ; ns p > 0.0167 *p < 0.0167 **p < 0.0033 ***p < 0.00033	9-17
CC	CTL vs 5'shSrpx2, p = 0.0012 ** CTL vs 5'shSrpx2 + Tubacin, p =0.0433 ns 5'shSrpx2 vs 5'shSrpx2 + Tubacin, p < 0.0008 **	
6C		17-21
Total dendritic length	Kruskal-Wallis test, p < 0.0001 Mann Whitney test, two-tailed Bonferroni correction; ns p > 0.0167 *p < 0.0167 **p < 0.0033 ***p < 0.00033 CTL vs 5'shSrpx2, p=0.0002 *** CTL vs 5'shSrpx2 +Tubacin, p=0.9495 ns 5'shSrpx2 vs 5'shSrpx2 +Tubacin, p=0.0006 **	
Number of dendritic branches	Kruskal-Wallis test, p < 0.0001 Mann Whitney test, two-tailed Bonferroni correction; ns p > 0.0167 *p < 0.0167 **p < 0.0033 ***p < 0.00033 CTL vs 5'shSrpx2, p < 0.0001 *** CTL vs 5'shSrpx2 +Tubacin, p=0.0178 ns 5'shSrpx2 vs 5'shSrpx2 +Tubacin, p < 0.0001 ***	
Number of dendritic trunks	Kruskal-Wallis test, p < 0.0001 Mann Whitney test, two-tailed Bonferroni correction; ns p > 0.0167 *p < 0.0167 **p < 0.0033 ***p < 0.00033 CTL vs 5'shSrpx2, p=0.5665 ns CTL vs 5'shSrpx2 +Tubacin, p=0.2281 ns 5'shSrpx2 vs 5'shSrpx2 +Tubacin, p=0.091 ns	
Number of dendritic branches / Number of dendritic trunks	Kruskal-Wallis test, p < 0.0001 Mann Whitney test, two-tailed Bonferroni correction; ns p > 0.0167 *p < 0.0167 **p < 0.0033 ***p < 0.00033 CTL vs 5'shSrpx2, p < 0.0001 *** CTL vs 5'shSrpx2 +Tubacin, p=0.0105 ns 5'shSrpx2 vs 5'shSrpx2 +Tubacin, p=0.0005 **	

7D -70mv	Fisher's Exact Test, two tailed Bonferroni correction; ns p > 0.0167 *p < 0.0167 **p < 0.0033 ***p < 0.00033 CTL vs 5'shSrpx2, p<0.0001, *** CTL vs 5'shSrpx2 + Tubacin, p=0.7 ns 5'shSrpx2 vs 5'shSrpx2 + Tubacin, p<0.0001, ***	21-30
0mv	Fisher's Exact Test, two tailed Bonferroni correction; ns p > 0.0167 *p < 0.0167 **p < 0.0033 ***p < 0.00033 CTL vs 5'shSrpx2, p<0.0001, *** CTL vs 5'shSrpx2 + Tubacin, p=0.49 ns 5'shSrpx2 vs 5'shSrpx2 + Tubacin, p=0.0007 **	
7G charge density, -70mv	Kruskal-Wallis test, p=0.01202 Dunn's Multiple Comparison Test; ns p > 0.05 *p < 0.05 **p < 0.01 ***p < 0.001 CTL vs 5'shSrpx2, * CTL vs 5'shSrpx2 + Tubacin, ns 5'shSrpx2 vs 5'shSrpx2 + Tubacin, *	13-30
7J charge density, 0mv	Kruskal-Wallis test, p=0.1694 Dunn's Multiple Comparison Test; ns p > 0.05 *p < 0.05 **p < 0.01 ***p < 0.001 CTL vs 5'shSrpx2, ns CTL vs 5'shSrpx2 + Tubacin, ns 5'shSrpx2 vs 5'shSrpx2 + Tubacin, ns	
Supplementary Fig.2B S16	Mann Whitney test, two-tailed; ns p > 0.05 *p < 0.05 **p < 0.01 ***p < 0.001 5'shSrpx2 vs 5'm3shSrpx2, p=0.0055 ** 3'shSrpx2 vs 3'm3shSrpx2, p=0.0417 *	3-10
Supplementary Fig.2C L23	Mann Whitney test, two-tailed; ns p > 0.05 *p < 0.05 **p < 0.01 ***p < 0.001 5'shSrpx2 vs 5'm3shSrpx2, p=0.0042 ** 3'shSrpx2 vs 3'm3shSrpx2, p=0.0222 *	3-8
Supplementary Fig.3 RFP	Unpaired t test, two-tailed; ns p > 0.05 *p < 0.05 **p < 0.01 ***p < 0.001 Non-transfected vs Transfected neurons, p=0.2093 ns	48-239
5'm3shSrpx2	Unpaired t test, two-tailed; ns p > 0.05 *p < 0.05 **p < 0.01 ***p < 0.001 Non-transfected vs Transfected neurons, p=0.5882 ns	99-399
5'shSrpx2	Unpaired t test, two-tailed; ns p > 0.05 *p < 0.05 **p < 0.01 ***p < 0.001 Non-transfected vs Transfected neurons, p < 0.0001 ***	40-222
Supplementary Fig.4B Cx	Mann Whitney test, two-tailed; ns p > 0.05 *p < 0.05 **p < 0.01 ***p < 0.001 RFP vs 5'shSrpx2, p=0.1749 ns	3
IZ	Mann Whitney test, two-tailed; ns p > 0.05 *p < 0.05 **p < 0.01 ***p < 0.001 RFP vs 5'shSrpx2, p=0.3123 ns	
	Mann Whitney test, two-tailed; ns p > 0.05 *p < 0.05 **p < 0.01 ***p < 0.001	

SVZ/VZ	RFP vs 5'shSrpx2, p=0.5067 ns	
Supplementary Fig.5A	Mann Whitney test, two-tailed; ns p > 0.05 *p < 0.05 **p < 0.01 ***p < 0.001 RFP vs 5'shSrpx2, p=0.9372 ns	6
Supplementary Fig.5B	Mann Whitney test, two-tailed; ns p > 0.05 *p < 0.05 **p < 0.01 ***p < 0.001 RFP vs 5'shSrpx2, p=0.2963 ns	6
Supplementary Fig.5C	Mann Whitney test, two-tailed; ns p > 0.05 *p < 0.05 **p < 0.01 ***p < 0.001 RFP vs 5'shSrpx2, p=0.5964 ns	7-9
Supplementary Fig.7A	Kruskal-Wallis test, p < 0.0001 Mann Whitney test, two-tailed Bonferroni correction; ns p > 0.025 *p < 0.025 **p < 0.005 ***p < 0.0005	7-26
HEK293	CTL vs Rn.Srpx2, p < 0.0001 *** CTL vs Hs.SRPX2, p < 0.0001 ***	
Supplementary Fig. 9A	Kruskal-Wallis test, p < 0.0001 Mann Whitney test, two-tailed Bonferroni correction; ns p > 0.0167 *p < 0.0167 **p < 0.0033 ***p < 0.00033	3-12
CP	CTL vs Hs.SRPX2-GFP, p=0.969 ns CTL vs Hs.SRPX2-Y72S-GFP, p=0.5522 ns CTL vs Hs.SRPX2-N327S-GFP, p=0.0008 **	
	Kruskal-Wallis test, p < 0.0001 Mann Whitney test, two-tailed Bonferroni correction; ns p > 0.0167 *p < 0.0167 **p < 0.0033 ***p < 0.00033	
IZ	CTL vs Hs.SRPX2-GFP, p=0.3027 ns CTL vs Hs.SRPX2-Y72S-GFP, p=0.7182 ns CTL vs Hs.SRPX2-N327S-GFP, p=0.2684 ns	
	Kruskal-Wallis test, p < 0.0001 Mann Whitney test, two-tailed Bonferroni correction; ns p > 0.0167 *p < 0.0167 **p < 0.0033 ***p < 0.00033	
VZ/SVZ	CTL vs Hs.SRPX2-GFP, p=0.0338 ns CTL vs Hs.SRPX2-Y72S-GFP, p=0.8286 ns CTL vs Hs.SRPX2-N327S-GFP, p=0.0019 **	
Supplementary Fig. 9B	Kruskal-Wallis test, p < 0.0001 Mann Whitney test, two-tailed Bonferroni correction; ns p > 0.0167 *p < 0.0167 **p < 0.0033 ***p < 0.00033	3-8
CP	5'shSrpx2 vs 5'shSrpx2 + Hs.SRPX2-GFP, p=0.0121* 5'shSrpx2 vs 5'shSrpx2 + Hs.SRPX2-Y72S-GFP, p=0.9999 ns 5'shSrpx2 vs 5'shSrpx2 + Hs.SRPX2-N327S-GFP, p=0.8081 ns	
	Kruskal-Wallis test, p < 0.0001 Mann Whitney test, two-tailed Bonferroni correction; ns p > 0.0167 *p < 0.0167 **p < 0.0033 ***p < 0.00033	
IZ	5'shSrpx2 vs 5'shSrpx2 + Hs.SRPX2-GFP, p=0.0121 * 5'shSrpx2 vs 5'shSrpx2 + Hs.SRPX2-Y72S-GFP, p=0.6303 ns	

	5'shSrpx2 vs 5'shSrpx2 + Hs.SRPX2-N327S-GFP, p=0.2828 ns	
	Kruskal-Wallis test, p < 0.0001	
	Mann Whitney test, two-tailed	
	Bonferroni correction; ns p > 0.0167 *p < 0.0167 **p < 0.0033 ***p < 0.00033	
VZ/SVZ	5'shSrpx2 vs 5'shSrpx2 + Hs.SRPX2-GFP, p=0.0121 *	
	5'shSrpx2 vs 5'shSrpx2 + Hs.SRPX2-Y72S-GFP, p=0.497 ns	
	5'shSrpx2 vs 5'shSrpx2 + Hs.SRPX2-N327S-GFP, p=0.2141 ns	
Supplementary Fig.9C	Kruskal-Wallis test, p=0.0015	5-7
	Mann Whitney test, two-tailed	
	Bonferroni correction; ns p > 0.0167 *p < 0.0167 **p < 0.0033 ***p < 0.00033	
Cx	GFP vs Hs.SRPX2-N327S-GFP, p=0.0043 *	
	GFP vs Hs.SRPX2-N327S-GFP + Rn.Srpx2-GFP, p=0.0732 ns	
	Hs.SRPX2-N327S-GFP vs Hs.SRPX2-N327S-GFP + Rn.Srpx2-GFP, p=0.0012 **	
	Kruskal-Wallis test, p=0.0536	
	Mann Whitney test, two-tailed	
	Bonferroni correction; ns p > 0.0167 *p < 0.0167 **p < 0.0033 ***p < 0.00033	
IZ	GFP vs Hs.SRPX2-N327S-GFP, p=0.6623 ns	
	GFP vs Hs.SRPX2-N327S-GFP + Rn.Srpx2-GFP, p=0.0653 ns	
	Hs.SRPX2-N327S-GFP vs Hs.SRPX2-N327S-GFP + Rn.Srpx2-GFP, p=0.0426 ns	
	Kruskal-Wallis test, p=0.0005	
	Mann Whitney test, two-tailed	
	Bonferroni correction; ns p > 0.0167 *p < 0.0167 **p < 0.0033 ***p < 0.00033	
SVZ/VZ	GFP vs Hs.SRPX2-N327S-GFP, p=0.0043 *	
	GFP vs Hs.SRPX2-N327S-GFP + Rn.Srpx2-GFP, p=0.0025 **	
	Hs.SRPX2-N327S-GFP vs Hs.SRPX2-N327S-GFP + Rn.Srpx2-GFP, p=0.0012 **	
Supplementary Fig.10A-C	Fisher's exact test, two-tailed; ns p > 0.05 *p < 0.05 **p < 0.01 ***p < 0.001	6-7
	DMSO vs Tubacin, p=0.00058 ***	
Supplementary Fig.10D	Mann Whitney test, two-tailed; ns p > 0.05 *p < 0.05 **p < 0.01 ***p < 0.001	11
	DMSO vs Tubacin, p=0.026, *	
Supplementary Fig.10E	Mann Whitney test, two-tailed; ns p > 0.05 *p < 0.05 **p < 0.01 ***p < 0.001	5
20	DMSO vs Tubacin, p=0.42 ns	
40	DMSO vs Tubacin, p=0.42 ns	
60	DMSO vs Tubacin, p=0.42 ns	
80	DMSO vs Tubacin, p=0.69 ns	
100	DMSO vs Tubacin, p=0.16 ns	
Supplementary Fig.11B	Fisher's exact test, two-tailed, p=0.0125	12-19
	ns p > 0.05 *p < 0.05 **p < 0.01 ***p < 0.001	
	Naive vs 5'shSrpx2, p=0.031 *	
	RFP vs 5'shSrpx2, p=0.0117 *	
Supplementary Fig.11I	Kruskal-Wallis test, p < 0.0001	13-30
	Dunn's Multiple Comparison Test; ns p > 0.05 *p < 0.05 **p < 0.01 ***p < 0.001	

amplitude, -70mv	CTL vs 5'shSrpx2+GFP, *** CTL vs 5'shSrpx2 nc, *** CTL vs 5'shSrpx2+Tubacin+GFP, ns CTL vs 5'shSrpx2+Tubacin nc, ns 5'shSrpx2+GFP vs 5'shSrpx2 nc, ns 5'shSrpx2+GFP vs 5'shSrpx2+Tubacin+GFP, *** 5'shSrpx2 nc vs 5'shSrpx2+Tubacin nc, ** 5'shSrpx2+Tubacin+GFP vs 5'shSrpx2+Tubacin nc, ns Kruskal-Wallis test, p < 0.0001 Dunn's Multiple Comparison Test; ns p > 0.05 *p < 0.05 **p < 0.01 ***p < 0.001	
charge, -70mv	CTL vs 5'shSrpx2+GFP, *** CTL vs 5'shSrpx2 nc, *** CTL vs 5'shSrpx2+Tubacin+GFP, ns CTL vs 5'shSrpx2+Tubacin nc, ns 5'shSrpx2+GFP vs 5'shSrpx2 nc, ns 5'shSrpx2+GFP vs 5'shSrpx2+Tubacin+GFP, *** 5'shSrpx2 nc vs 5'shSrpx2+Tubacin nc, *** 5'shSrpx2+Tubacin+GFP vs 5'shSrpx2+Tubacin nc, ns Kruskal-Wallis test, p < 0.0001 Dunn's Multiple Comparison Test; ns p > 0.05 *p < 0.05 **p < 0.01 ***p < 0.001	
amplitude, 0mv	CTL vs 5'shSrpx2+GFP, * CTL vs 5'shSrpx2 nc, *** CTL vs 5'shSrpx2+Tubacin+GFP, ns CTL vs 5'shSrpx2+Tubacin nc, ns 5'shSrpx2+GFP vs 5'shSrpx2 nc, ns 5'shSrpx2+GFP vs 5'shSrpx2+Tubacin+GFP, *** 5'shSrpx2 nc vs 5'shSrpx2+Tubacin nc, *** 5'shSrpx2+Tubacin+GFP vs 5'shSrpx2+Tubacin nc, ns Kruskal-Wallis test, p < 0.0001 Dunn's Multiple Comparison Test; ns p > 0.05 *p < 0.05 **p < 0.01 ***p < 0.001	
charge, 0mv	CTL vs 5'shSrpx2+GFP, *** CTL vs 5'shSrpx2 nc, *** CTL vs 5'shSrpx2+Tubacin+GFP, *** CTL vs 5'shSrpx2+Tubacin nc, *** 5'shSrpx2+GFP vs 5'shSrpx2 nc, ns 5'shSrpx2+GFP vs 5'shSrpx2+Tubacin+GFP, ** 5'shSrpx2 nc vs 5'shSrpx2+Tubacin nc, ns 5'shSrpx2+Tubacin+GFP vs 5'shSrpx2+Tubacin nc, *	
Supplementary Fig.12C -70mv	Fisher's Exact Test, two tailed ns p > 0.05 *p < 0.05 **p < 0.01 ***p < 0.001 wt-SRPX2 vs N327S-SRPX2, p=0.016, *	25-33
0mv	Fisher's Exact Test, two tailed ns p > 0.05 *p < 0.05 **p < 0.01 ***p < 0.001 wt-SRPX2 vs N327S-SRPX2, p=0.19 ns	

VZ: ventricular zone. SVZ: subventricular zone. IZ: intermediate zone. CP: cortical plate. CC: *corpus callosum*. Cx: cortex. nc: neighboring (non-electroporated) cells. ns: not significant.

Supplementary Table 2. List of primers (from 5' to 3').

hsSRPX2-F	AAAAAGAATTCAGGATGGCCAGTCAGCTAACTCAAA
hsSRPX2-R	AAAAAGCGGCCGCCTCGCATATGTCCCTTTGCTCC
rnSrpx2-F	AAAAAGAATTGAGGATGAAGACTGGTTCACTGACTC
rnSrpx2-R	AAAAAGCGGCCGCCTCGCAAACATCCCTCTGCTCC
qPCR-Srpx2-F	AAGAGGTGCGCTCTTATTGC
qPCR-Srpx2-R	TCATCTGGAGAATAACCTGAGC
qPCR-S16-F	ATATCCGGGTCCGTGTGA
qPCR-S16-R	GAGATAGACTGCCGGATAGC
qPCR-L23-F	AGACTTCCTGCTGCTGGTGT
qPCR-L23-R	TTCGTTGTCGAATCACCACT
ISH-Srpx2-F	GGAGGAAATGTTTTCCCACA
ISH-Srpx2-R	CTTTCGAAGCTCCTCCAGTG

Supplementary Table 3. List of primary antibodies.

Immunocytochemistry	
Rabbit anti-RFP	1:2000, Rockland
Rabbit anti-SRPX2	1:400 (Roll *et al.*, 2006; Royer-Zemmour *et al.*, 2008)
Mouse anti-acetylated alpha-tubulin	1:2000, clone 6-11B-1, Sigma
Rabbit anti-alpha-tubulin	1:2000, Millipore
Mouse anti-MAP2	1:150, clone HM-2, Sigma
Mouse anti-uPAR	1:50, American Diagnostica
Immunohistochemistry	
Rabbit anti-Ki67	1:300, Millipore
Rabbit anti-pHH3	1:300, Millipore
Rabbit anti-RFP	1:2000, Rockland
Rabbit anti-activated Caspase 3	1:200, Cell Signaling
Rabbit anti-Pax6	1:700, Covance
Rabbit anti-GABA	1:500, Sigma
Rabbit anti-SRPX2	1:50 (Roll *et al.*, 2006; Royer-Zemmour *et al.*, 2008)
Rat anti-BrdU	1:500, Oxford Biotechnology Ltd
Rat anti-Somatostatin	1:500, Millipore
Mouse anti-Vimentin	1:300, Millipore
Mouse anti-NeuN	1:500, Millipore
Mouse anti-Tuj1	1:500, Covance
Mouse anti-Nestin	1:300, BD Biosciences

Goat anti-uPAR	1:50, clone M17, Santa Cruz Biotech
Goat anti-Parvalbumin	1:500, Swant
Goat anti-Calretinin	1:500, Swant
Guinea pig anti-Calbindin	1:500, Systems
Immunoblotting	
Mouse anti-GAPDH	1:1000, clone 6C5, Millipore
Rabbit anti-SRPX2	1:250 (Roll *et al.*, 2006; Royer-Zemmour *et al.*, 2008)
Rabbit anti-HDAC6	1:1000, Millipore
Rabbit anti-SIRT2	1:1000, Sigma
Rabbit anti-ELP3	1:1000, Thermo Scientific
Rabbit anti-MEC-17	1:1000, Sigma
Rabbit anti-acetylated cortactin	1:1000, Millipore
Mouse anti cortactin	1:1000, clone 4F11, Millipore
Mouse anti-acetylated alpha-tubulin	1:1000, clone 6-11B-1, Sigma
Mouse anti-alpha-tubulin	1:1000, clone DM1A, Sigma

Supplementary Movie 1. Neuronal migration in brain slice from control-electroporated embryo.

DIV: days *in vitro*.

Supplementary Movie 2. Neuronal migration in brain slice from 5'shSrpx2-electroporated embryo.

DIV: days *in vitro*.

Supplementary Movie 3. No epileptic seizure at P14 after PTZ administration in control electroporated rat.

PTZ: pentylenetetrazole.

Supplementary Movie 4. PTZ-induced generalized tonic-clonic seizure at P14 in *in utero* *Srpx2*-silenced rat.

PTZ: pentylenetetrazole.

frontiers in Cellular Neuroscience

ORIGINAL RESEARCH
published: 29 May 2015
doi: 10.3389/fncel.2015.00210

Glutamatergic synaptic currents of nigral dopaminergic neurons follow a postnatal developmental sequence

*Edouard Pearlstein[1,2], Laurie-Anne Gouty-Colomer[1,2], François J. Michel[1,2], Robin Cloarec[1,2] and Constance Hammond[1,2]**

[1] UMR 901, Aix-Marseille Université, Marseille, France, [2] Institut de Neurobiologie de la Méditerranée, Inserm UMR 901, Marseille, France

The spontaneous activity pattern of adult dopaminergic (DA) neurons of the substantia nigra pars compacta (SNc) results from interactions between intrinsic membrane conductances and afferent inputs. In adult SNc DA neurons, low-frequency tonic background activity is generated by intrinsic pacemaker mechanisms, whereas burst generation depends on intact synaptic inputs in particular the glutamatergic ones. Tonic DA release in the striatum during pacemaking is required to maintain motor activity, and burst firing evokes phasic DA release, necessary for cue-dependent learning tasks. However, it is still unknown how the firing properties of SNc DA neurons mature during postnatal development before reaching the adult state. We studied the postnatal developmental profile of spontaneous and evoked AMPA and NMDA (*N*-Methyl-D-aspartic acid) receptor-mediated excitatory postsynaptic currents (EPSCs) in SNc DA neurons in brain slices from immature (postnatal days P4–P10) and young adult (P30–P50) tyrosine hydroxylase (TH)-green fluorescent protein mice. We found that somato-dendritic fields of SNc DA neurons are already mature at P4–P10. In contrast, spontaneous glutamatergic EPSCs show a developmental sequence. Spontaneous NMDA EPSCs in particular are larger and more frequent in immature SNc DA neurons than in young adult ones and have a bursty pattern. They are mediated by GluN2B and GluN2D subunit-containing NMDA receptors. The latter generate long-lasting, DQP 1105-sensitive, spontaneous EPSCs, which are transiently recorded during this early period. Due to high NMDA activity, immature SNc DA neurons generate large and long lasting NMDA receptor-dependent (APV-sensitive) bursts in response to the stimulation of the subthalamic nucleus. We conclude that the transient high NMDA activity allows calcium influx into the dendrites of developing SNc DA neurons.

Keywords: substantia nigra, dopaminergic neurons, development, AMPA receptors, NMDA receptors, EPSC, NR2D subunit, patch clamp

OPEN ACCESS

Edited by:
Qi Yuan, Memorial University, Canada

Reviewed by:
Matthew Philip Parsons, University of British Columbia, Canada
De-Lai Qiu, Yanbian University, China
Yevgenia Kozorovitskiy, Northwestern University, USA

****Correspondence:***
Constance Hammond, Institut de Neurobiologie de la Méditerranée, Inserm UMR901, 163 Route de Luminy, BP13, 13273 Marseille Cedex 9, France
constance.hammond@inserm.fr

Received: *14 January 2015*
Accepted: *15 May 2015*
Published: *29 May 2015*

Citation:
Pearlstein E, Gouty-Colomer L-A, Michel FJ, Cloarec R and Hammond C (2015) Glutamatergic synaptic currents of nigral dopaminergic neurons follow a postnatal developmental sequence. Front. Cell. Neurosci. 9:210. doi: 10.3389/fncel.2015.00210

Introduction

The dopaminergic (DA) neurons of the substantia nigra pars compacta (SNc, A9) are involved in the control of reward-related behavior and motor performances (Schultz, 2013). The spontaneous activity pattern of adult SNc DA neurons results from the interactions between intrinsic and synaptic currents. In adult rodents *in vivo*, this varies between a slow, intrinsically generated,

pacemaker-like firing pattern and an irregular pattern with bursts triggered by the transient interaction between ionotropic glutamate receptors and voltage gated ionic channels (Bunney et al., 1973; Grace and Bunney, 1984a,b; Grace and Onn, 1989; Hyland et al., 2002; Fa et al., 2003; Deister et al., 2009). *In vitro*, only the pacemaker-like pattern is observed (Grace and Onn, 1989; Yung et al., 1991; Richards et al., 1997; Gulacsi et al., 2003; Paladini and Roeper, 2014), except in slices from juvenile (P15–P21) rats, where a small proportion of SNc neurons show bursting activity *in vitro* (Mereu et al., 1997).

The firing rate and firing pattern of SNc neurons are major determinants of the levels of dopamine released from terminals. The robustness of pacemaking underlies its biological importance in delivering a constant basal level of DA in target basal ganglia nuclei such as the striatum, to provide a general motivating function (Wise, 2004). In contrast, burst firing greatly and transiently increases dopamine release (Gonon, 1988; Manley et al., 1992; Chergui et al., 1994; Grillner and Mercuri, 2002), which in turn promotes the corticostriatal plasticity necessary for habit-learning (Reynolds and Wickens, 2000; Centonze et al., 2001; Calabresi et al., 2007; Kreitzer and Malenka, 2008; Schultz, 2013).

Interaction between glutamatergic afferents and ionotropic glutamate receptors play a major role in the generation of bursts in adult SNc DA neurons. Dendritic application of glutamate or NMDA (*N*-Methyl-D-aspartic acid) *in vitro* or stimulation of afferents at 50–100 Hz (but not 10 Hz) in the continuous presence of $GABA_A$, $GABA_B$, and D_2 receptor antagonists, generate *in vivo*-like burst firing (Grace and Bunney, 1983; Johnson et al., 1992; Smith and Grace, 1992; Chergui et al., 1993; Christoffersen and Meltzer, 1995; Meltzer et al., 1997; Blythe et al., 2007, 2009; Wang et al., 2011). Furthermore, SNc DA bursts triggered by electrical stimulation of glutamatergic afferents or iontophoretic application of glutamate/aspartate in brain slices are blocked by NMDA receptor antagonists (Deister et al., 2009). Accordingly, genetic inactivation of NMDA receptors selectively in SNc DA neurons impairs spontaneous and evoked burst firing without affecting pacemaker-like activity (Zweifel et al., 2009). In juvenile rats, both AMPA (α-amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isoxazolepropionic acid) and NMDA receptors are critical for transient burst-like, high-frequency firing (Blythe et al., 2007). Juvenile (P7–P28) rodent SNc neurons express AMPA-evoked currents mediated by GluA2-containing AMPA receptors, kainate (KA)-evoked currents mediated by GluK3 and GluK5-containing KA receptors and NMDA-evoked currents mediated by GluN2B- and GluN2D-containing (but not GluN2A-containing) NMDA receptors (Mereu et al., 1991; Bischoff et al., 1997; Gotz et al., 1997; Wullner et al., 1997; Counihan et al., 1998; Chatha et al., 2000; Lin and Lipski, 2001; Vivo et al., 2002; Jones and Gibb, 2005; Brothwell et al., 2008; Suarez et al., 2010). AMPA and NMDA receptors are selectively localized to a subpopulation of asymmetric synapses in the adult SNc and the two receptor types, at least partially, co-localize at individual synapses (Chatha et al., 2000).

Glutamatergic afferents to SNc neurons mainly originate in the subthalamic (STN) and pedunculopontine (PPN) nuclei. STN and PPN axons form asymmetric synapses on medium-sized and small SNc dendrites. The PPN boutons tend to form synapses onto larger diameter dendrites than the STN boutons (Hammond et al., 1978; Jackson and Crossman, 1983; Scarnati et al., 1984; Rye et al., 1987; Rinvik and Ottersen, 1993; Futami et al., 1995; Takakusaki et al., 1996).

Since AMPA and NMDA receptor activation generates transient high-frequency activity in SNc DA neurons, plasticity in their number, distribution and/or subunit composition during development could modify excitatory synaptic integration in SNc DA neurons, and thus their activity pattern later in adulthood. We therefore investigated the postnatal development of synaptic AMPA and NMDA receptor-mediated currents and how they influence the ability of SNc neurons to generate bursts in response to STN stimulation.

Materials and Methods

All experiments were approved by the Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale (INSERM) animal care and use agreement (D-13-055-19) and the European Community Council Directive (2010/63/UE). Animals had access to food and water ad libitum and were housed in our institutional animal facilities under a 12 h light/dark cycle at 22–24°C.

Mice

We used mice expressing the green fluorescent protein (GFP) under the control of the promoter of tyrosine hydroxylase (TH-GFP mice). TH-GFP mice (C57BL/6 strain; Matsushita et al., 2002) were initially backcrossed on a 129 sv background and then interbred with wild-type 129 sv mice to generate the study population of heterozygous TH-GFP mice. At P2–P5, TH-GFP pups were easily differentiated via a UV lamp from wild-type pups, because they have a fluorescent navel. Immunocytochemistry for TH in nigral slices from THGFP mice showed that only 4% of GFP-positive SNc neurons were TH-negative (**Supplementary Figure S1**).

Slice Preparation

Mice of either sex were killed at age P4–P10 and P30–P50 (P30+) by decapitation under halothane anesthesia. Coronal or sagittal slices (400 μm thick) were cut in ice-cold oxygenated solution containing (in mM): 110 choline, 2.5 KCl, 1.25 NaH_2PO_4, 7 $MgCl_2$, 0.5 $CaCl_2$, 25 $NaHCO_3$, seven glucose. During the recovery period, slices were placed at room temperature in standard artificial CSF (ACSF) saturated with 95% O_2/5% CO_2 and containing (in mM): 126 NaCl, 3.5 KCl, 1.2 NaH_2PO_4, 1.3 $MgCl_2$, 2 $CaCl_2$, 25 $NaHCO_3$, 11 glucose.

Electrophysiology

We recorded the activity of SNc TH-GFP neurons in the SNc dorsal to SN reticulate. We used two groups of mice: immature (P4–P10) and young adults (P30–P50). All recordings were made at 32°C. Cells were visualized with infrared-differential interference optics (Axioskop2, Zeiss). For whole-cell voltage-clamp recordings of AMPA EPSCs and spikes, the pipette

(6–10 MΩ) contained (in mM): 128.5 K-gluconate, 11.5 KCl, 1 $CaCl_2$, 10 EGTA, 10 HEPES, 2.5 MgATP, 0.3 NaGTP, pH 7.32, 280 mOsm and for the recording of NMDA EPSCs, the pipette contained (in mM): 120 Cs-gluconate, 13 CsCl, 1 $CaCl_2$, 10 HEPES, 10 EGTA, pH 7.2–7.4, 275–285 mOsm. Biocytin (Sigma, 5 mg/ml) was added to the pipette solution and osmolarity was corrected when necessary. We performed patch-clamp recordings in whole-cell configuration using the Digidata 1344A interface, the Multiclamp 700 A amplifier, and PClamp8 software (Molecular Devices). Access resistance ranged between 10 and 30 MΩ, and the results were discarded if access resistance changed by >20%. Since 4% of GFP-positive SNc neurons appeared to be TH-negative, we identified SNc DA according to several criteria. During recordings we identified them from their location at the dorsal edge of SN, their GFP fluorescence and their typical electrophysiological characteristics (in K gluconate recordings), i.e., action potentials of long duration (>2 ms) and a pronounced sag in response to hyperpolarizing steps. After recordings we checked the location of the recorded neurons in the SNc and their morphological characteristics (see Cell Labeling and TH Immunocytochemistry). We measured Ih amplitude by subtracting the amplitude of the current at the end of the 800 ms hyperpolarizing step to –140 mV (V_H = –60 mV) from the amplitude of the current 15 ms after the first capacitative current.

We measured spontaneous AMPA/KA currents in voltage-clamp mode at V_H = –60 mV in the continuous presence of Gabazine (5 μM) to block $GABA_A$ receptors. We measured spontaneous NMDA currents in voltage-clamp mode at V_H = +40 mV in the continuous presence of Gabazine (5 μM) and NBQX (2,3-dihydroxy-6-nitro-7-sulfamoyl-benzo (f)quinoxaline-2,3-dione, 10 μM) to block $GABA_A$ and AMPA/KA receptors, respectively. These currents were stored on a computer using Pclamp8 software (Molecular Devices) and analyzed off-line with Mini Analysis software (Synaptosoft 6.0), to determine the inter-event intervals (IEIs), amplitude, rise time, and decay time of spontaneous currents. The decay of spontaneous synaptic currents was well fitted by a single-exponential function, starting at the peak of the current to the time point when the current had decayed to 99.9% of its peak amplitude. All detected currents were then visually inspected to reject artifactual events. To quantify the respective contribution of AMPA receptors and KA receptors to synaptic transmission, we performed experiments in the presence of 1 μM NBQX at a dose which preferentially antagonizes AMPA receptors. NMDA spontaneous EPSCs (sEPSCs) occurred either as single events or in bursts. We defined a burst of NMDA sEPSCs as the occurrence of at least three superimposed NMDA sEPSCs and a bursty pattern as at least two bursts/cell/3 min. Miniature AMPA or NMDA currents, recorded in the presence of TTX (1 μM), were not studied because they had an extremely low frequency at all ages tested.

STN Stimulation

We performed stimulation of the STN and whole-cell recordings of glutamatergic post-synaptic responses (EPSPs and spikes) from SNc DA neurons in current clamp mode, in medial sagittal slices, where projections from STN to SNc neurons are functional (Falkenburger et al., 2001). We delivered rectangular pulses of fixed duration (200 μs) and 100–600 μA amplitude at a frequency of 0.01–50 Hz (Grass stimulator) between the two poles of an electrode made from twisted Formvar insulated nichrom wires (66 μm diameter each, A–M Systems) positioned in the middle of the STN (only the very tips of the wires were not insulated). Postsynaptic responses evoked in SNc DA neurons by high frequency (50 Hz) stimulation of the STN in the continuous presence of gabazine (5 μM) were defined as bursts of spikes when they consisted of a depolarization giving rise to a train of action potentials that outlasted the depolarizing step. The duration of spikes (half width) was measured at half maximal amplitude.

Drugs

Drugs were prepared as concentrated stock solutions and diluted in ACSF for bath application: gabazine, a $GABA_A$ receptor antagonist, and APV (D-(-)-2-amino-5-phosphonopentanoic acid), an NMDA receptor antagonist and tetrodotoxin (TTX) a blocker of voltage-gated Na^+ channels were purchased from Sigma. NBQX, an AMPA/KA receptor antagonist and was donated by the National Institute of Mental Health, NIMH chemical synthesis and drug supply program. DQP 1105 [5-(4-Bromophenyl)-3-(1,2-dihydro-6-methyl-2-oxo-4-phenyl-3-quinolinyl)-4,5-dihydro-g-oxo-1H-pyrazole-1-butanoic acid] (10 μM), a non-competitive NMDA receptor antagonist which displays over 50-fold selectivity for GluN2D- and GluN2C-containing receptors over GluN2B- containing receptors, and Ro 25-6981 maleate (αR,βS)-α-(4-Hydroxyphenyl)-β-methyl-4-(phenylmethyl)-1-piperidinepropanol maleate) (1 μM), a selective activity-dependent blocker of NMDA receptors containing the GluN2B subunit, were both purchased from Tocris.

Cell Labeling and TH Immunocytochemistry

After the recording session, to localize and analyze the recorded SNc DA neurons, we visualized the biocytin-injected neurons. After 24 h in paraformaldehyde (3%) at 4°C, the sections were rinsed in PBS and preincubated for 1 h in 0.3% Triton X-100 (Abcys) in PBS with 5% normal goat serum (NGS) at room temperature. Slices were then incubated in Streptavidin-Cy3 (1:500) in PBS-Triton X-100 (0.3%) and NGS (5%) for 12 h at 4°C. After thorough rinsing, slices were mounted in Fluoromount and coverslipped. Confocal Images were taken with a Leica SP5-X (objective ×40, NA = 1.3) and stacks were filtered (median 3D) and stitched (3D stitching) with FIJI software (ImageJA v1.46b, Open source software, http://pacific.mpi-cbg.de). Dendritic and axonal arbors were reconstructed for morphological analysis using the Neurolucida system (MicroBrightField Inc.). To check whether GFP expression was restricted to TH-positive neurons of the SNc, slices were incubated in anti-TH polyclonal antibody (Pel-Freez, dilution of 1:1000) for 12 h. After rinsing with PBS, slices were incubated in anti-rabbit IgG secondary antibody Alexa A555 (Life Technologies, dilution of 1:500) for 1 h. To count TH-positive and GFP-positive neurons, images were taken with a

Zeiss observer Z1 microscope with Apotome device (structured illumination), 20× magnification.

Statistics

Results are given in the text and figures in the form of mean ± SEM. Non-parametric Mann–Whitney test (Graphpad Prism 5 software, San Diego, CA, USA) was used to compare results from P4–P10 and P30+ SNc DA neurons. Since there was no significant difference between the full set of results obtained at P4–P5 and at P8–P10 for AMPA- and NMDA-mediated sEPSCs (data not shown), we pooled the results obtained between P4 and P10. For example, there was no significant difference for the frequency ($P = 0.3$), and amplitude ($P = 0.5$) of AMPA sEPSCs. Similarly, there was no significant difference for the frequency ($P = 0.35$), amplitude ($P = 0.52$) of single NMDA sEPSCs, nor for the characteristics of bursts of NMDA sEPSCs: burst frequency ($P = 0.34$), burst duration involving at least three events ($P = 0.15$), and mean intraburst frequency ($P = 0.15$). A non- parametric two-tailed paired *t*-test was used to compare values obtained at a given age before and during drug application. Kolmogorov–Smirnov test was used to compare cumulative distributions. For each test performed the P value was provided and the statistical significance was taken at $P \leq 0.05$.

Results

Developmental Characteristics of Dendritic Field and Intrinsic Membrane Properties of SNc DA Neurons

The dendritic field of SNc DA neurons did not significantly change between P4–P10 ($n = 13$) and P30+ ($n = 9$) (**Figure 1**). The mean number of dendritic trunks was 4 ± 1 at P4–P10 and 4 ± 1 at P30+ ($P = 0.7$), the mean number of dendritic ends was 13 ± 1 at P4–P10 and 12 ± 1 at P30+ ($P = 0.6$), the mean total dendritic length was 1386 ± 202 μm at P4–P10 and 1522 ± 249 at P30+ ($P = 0.6$) and the mean dendritic volume was $2.6 \times 10^6 \pm 0.7 \times 10^6$ μm^3 at P4–P10 and $5.7 \times 10^6 \pm 1.7 \times 10^6$ at P30 ($P = 0.1$). The axon originated either from the soma ($n = 5/13$ at P4–P10; $n = 2/9$ at P30+) or from a primary dendritic trunk ($n = 8/13$ at P4–P10; $n = 7/9$ at P30+), as already described for P15–P20 SNc DA neurons (Hausser et al., 1995; Gentet and Williams, 2007; Blythe et al., 2009).

The mean membrane resistance of P4–P10 neurons was twice as high (468.8 ± 54.5 MΩ, $n = 38$) as that of P30+ neurons (230.7 ± 18.1 MΩ, $n = 22$, $P = 0.0002$), but their mean membrane capacitance was similar for the two age groups (30.9 ± 2.9 pF and 32.3 ± 2.9 pF, respectively, $P = 0.58$). The amplitude of the inwardly rectifying H current (I_h) in response to hyperpolarizing pulses to −140 mV (V_H = −60 mV), was similar at P4–P10 (−327.3 ± 34.7 pA, $n = 32$) to that at P30+ (−272.3 ± 31.5 pA, $n = 11$, $P = 0.57$).

AMPA Receptor-Mediated sEPSCs Follow a Postnatal Developmental Sequence

We recorded sEPSCs (V_H = −60 mV) at P4–P10 and at P30+ that were insensitive to APV (40 μM), the specific antagonist of NMDA receptors, but fully blocked by the addition of NBQX 1 μM, a preferential antagonist of AMPA receptors ($n = 6$, data not shown). Application of 1 μM NBQX specifically blocked the AMPA receptor-mediated current and allowed the measurement of the KA receptor-mediated current. In this condition, we demonstrated that neither immature nor young adult SNc neurons generate spontaneous KA-receptor-mediated EPSCs.

AMPA receptor-mediated sEPSCs (AMPA sEPSCs) had larger amplitudes ($P = 0.017$) and longer IEIs ($P = 0.005$) in immature than in young adult SNc DA neurons. The mean amplitude and mean IEI were 16.0 ± 1.9 pA and 4.4 ± 0.7 s in P4–P10 SNc neurons ($n = 24$) and 11.8 ± 1.0 pA and 2.1 ± 0.4 s in P30+ SNc neurons ($n = 19$; **Figures 2A,B**). The cumulative frequency distributions for the amplitude or the IEIs of single AMPA EPSCs also differed significantly ($P = 0.018$ and $P < 0.001$, respectively; Kolmogorov–Smirnov test) between the two age groups (**Figure 2C**). Single AMPA sEPSCs had a similar rise time at P4–P10 and at P30+ (1.17 ± 0.08 ms, $n = 24$, 1.11 ± 0.09 ms,

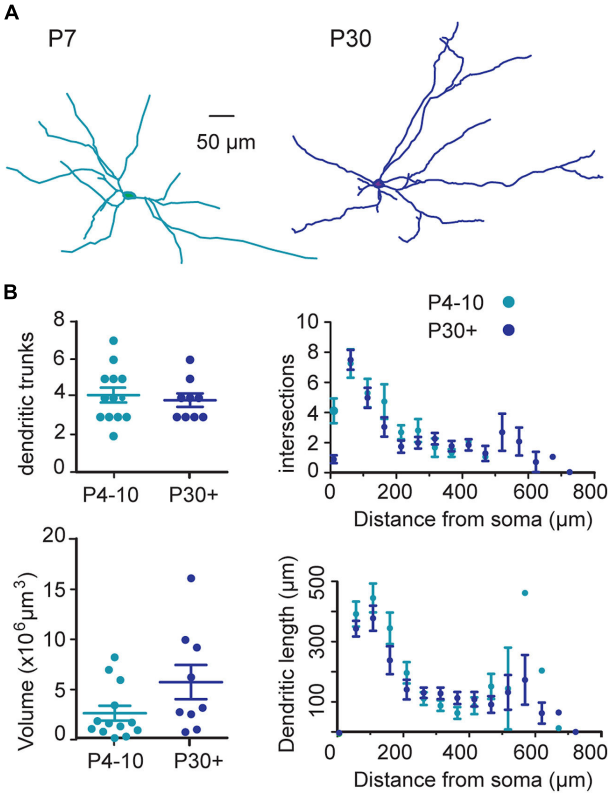


FIGURE 1 | Morphological properties of somato-dendritic fields of substantia nigra pars compacta (SNc) dopaminergic (DA) neurons during postnatal development. (A) Typical examples of neurolucida reconstruction of biocytin-filled SNc tyrosine hydroxylase (TH)-green fluorescent protein (GFP) neurons at the indicated ages. **(B)** Quantification and statistical comparison between P4–P10 and P30+ of the number of dendritic trunks (top left), of the convex hull volume occupied by the dendritic trees (bottom left), and of the extent of the dendritic trees (3D Scholl analysis) (top and bottom right). In this (**B**, left) and following figures, each dot represents one cell, the distance between bottom and top bars represents the SEM, and the middle bar indicates the mean value.

$n = 19$, respectively; $P = 0.6$) but had a longer mean decay time at P4–P10 (9.3 ± 1.7 ms) than at P30+ (6.0 ± 1.1 ms, $P < 0.0001$; **Figure 2D**). Similarly, cumulative frequency distributions for the rise time of AMPA-mediated sEPSCs did not differ significantly between P4–P10 and P30+ ($P > 0.99$), but the decay times were significantly different ($P < 0.0001$; **Figure 2D**). Therefore, AMPA sEPSCs in SNc DA neurons mature between P4–P10 and P30+.

NMDA Receptor-Mediated sEPSCs Follow a Postnatal Developmental Sequence

At P4–P10, single NMDA sEPSCs showed greater amplitude (29.3 ± 2.7 pA) and shorter IEIs (3.6 ± 0.6 s, $n = 20$ neurons) than at P30+ (amplitude 20.0 ± 1.7 pA; 6.2 ± 0.9 s, $n = 18$; $P = 0.007$ and 0.027, respectively; **Figures 3A,B**). The cumulative frequency distributions for the amplitude or the IEIs of single NMDA sEPSCs differed significantly ($P < 0.0001$ for both, Kolmogorov–Smirnov test) between the two age groups (**Figure 3C**). Single NMDA sEPSCs also showed a longer mean decay time at P4–P10 (92.6 ± 3.8 ms, $n = 20$) than at P30+ (75.5 ± 4.5 ms, $n = 18$, $P = 0.0003$) but a similar mean rise time (7.3 ± 0.2 ms and 7.6 ± 0.3 ms, $P = 0.44$). The cumulative frequency distributions also differed significantly between the two age groups with respect to decay time ($P < 0.0001$, Kolmogorov–Smirnov test), but not with respect to rise time ($P = 0.9$; **Figure 3D**). Strikingly, in the P4–P10 group but not in the P30+ one, NMDA sEPSCs often occurred in bursts. The bursty pattern was present in 60% of P4–P10 ($n = 12/20$) versus 11% (2/18) of P30+ SNc DA neurons. Moreover, P4–P10 bursts were more frequent and consisted of more events (mean burst frequency: 0.04 ± 0.01 Hz; mean burst duration: 416 ± 91 ms involving 3–21 events with a mean intraburst frequency of 17.3 ± 3.1 Hz; $n = 146$ bursts in 12 neurons) than P30+ bursts (mean burst frequency: 0.02 ± 0.01 Hz, mean burst duration: 259 ± 95 ms involving 3–5 events with a mean intraburst frequency of 19.1 ± 8.7 Hz, $n = 15$ bursts in three neurons; **Figure 4**). Statistical comparison between the two groups was rendered impossible by the very small number of bursts generated by young adult SNc DA neurons.

Early Bursting NMDA sEPSCs were Mediated by GluN2D-Containing NMDA Receptors

We investigated whether the developmental shift of NMDA sEPSCs was due to altered NMDA receptor subunit composition. During development SNc neurons express NMDA-evoked currents mediated by GluN2B- and GluN2D-containing (but not GluN2A-containing) NMDA receptors. We first tested DQP 1105, at a dose (10 μM) which preferentially blocks GluN2C/D-containing receptors. It decreased the frequency of P4–P10 single NMDA sEPSCs by 56% (from 0.32 ± 0.08 to 0.14 ± 0.04 Hz, $n = 8$ neurons; $P = 0.02$ non-parametric paired t-test) but had no effect on P30+ single NMDA sEPSCs amplitude (17.1 ± 2.3 pA before and 16.1 ± 1.7 pA during DQP, $n = 5$; $P = 0.3$) or frequency (0.14 ± 0.04 Hz before and 0.19 ± 0.05 Hz during DQP, $n = 5$; $P = 0.2$; **Figure 5**). DQP 1105 also significantly reduced the occurrence of bursts of P4–P10 NMDA sEPSCs (interburst frequency: 0.07 ± 0.02 Hz before and 0.010 ± 0.002 Hz during DQP; $P = 0.007$) but did not change either their duration (550 ± 137 ms before and 810 ± 456 ms during DQP; $P = 0.8$) or their intraburst frequency (12.0 ± 2.6 Hz before and 14 ± 3 Hz during DQP; $P = 0.8$; $n = 6$). Subsequent application of Ro 25-6981 (1 μM), a preferential blocker of GluN2B-containing

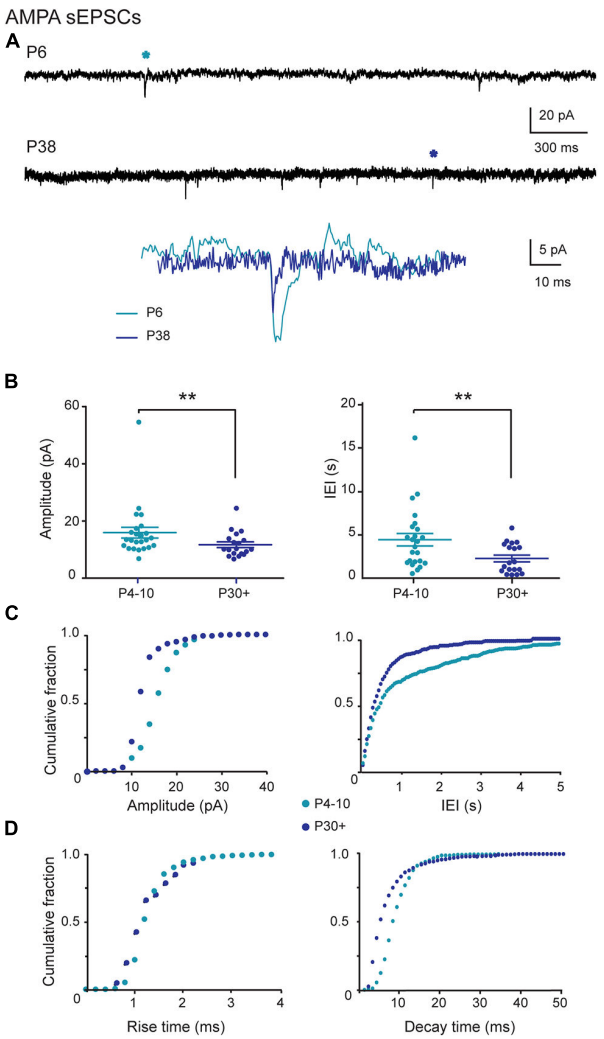


FIGURE 2 | AMPA (α-amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isoxazolepropionic acid) sEPSCs in SNc DA neurons during postnatal development. **(A)** Voltage-clamp recordings of AMPA sEPSCs from P4 and P30 midbrain TH-GFP neurons in the continuous presence of gabazine (5 μM) and APV (40 μM) at $V_H = -60$ mV. AMPA events indicated by a star are enlarged and superimposed in the inset. **(B)** Quantification and statistical comparison of the amplitudes and inter-event intervals (IEIs) of P4–P10 ($n = 24$) and P30+ ($n = 19$) AMPA sEPSCs. **(C)** Cumulative distributions of the amplitude and IEI of AMPA sEPSCs for the two age groups (bin width 1 pA and 50 ms). At P4–P10, 50% of single AMPA excitatory postsynaptic currents (EPSCs) had a amplitude of at most 15.9 pA and an IEI of at most 450 ms, whereas this median was 12.5 pA and 300 ms at P30+. **(D)** Cumulative distributions of the rise and decay times of AMPA sEPSCs for the two age groups (bin width 0.2 pA and 1 ms). The median rise and decay times were, respectively 1.2 and 8.0 ms at P4–P10, and 1.1 and 4.9 ms at P30+. Number of events: 1921 (P4–P10) and 1317 (P30+). In this and subsequent figures, when indicated, $^*P < 0.05$ and $^{**}P < 0.01$.

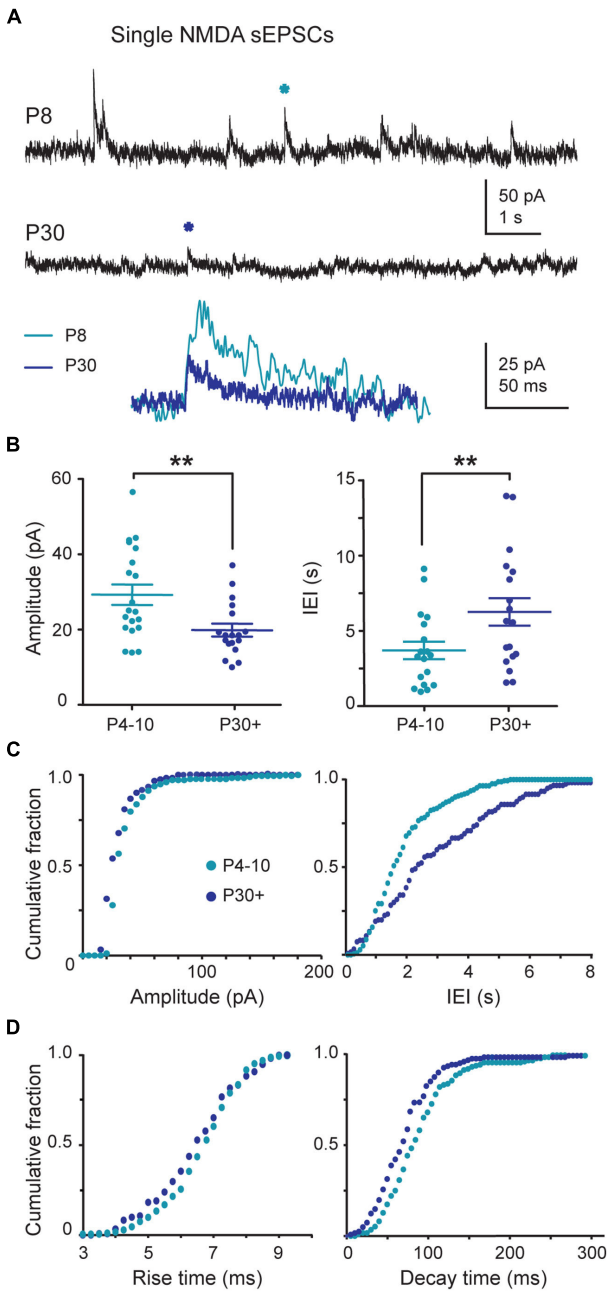


FIGURE 3 | Single NMDA (*N*-Methyl-D-aspartic acid) sEPSCs during postnatal development. (A) Voltage-clamp recordings of NMDA sEPSCs from P8 and P30 SNc TH-GFP neurons in the continuous presence of gabazine (5 μM) and NBQX (10 μM) at $V_H = +40$ mV. The P8 and P30 NMDA events indicated by a star are enlarged and superimposed in the inset. **(B)** Quantification and statistical comparison of the data from P4–P10 ($n = 20$) and P30+ ($n = 18$) NMDA sEPSCs, as indicated. **(C)** Cumulative distributions of the amplitude and IEI of single NMDA sEPSCs for the two age groups (bin width 5 pA and 100 ms). At P4–P10, 50% of single NMDA EPSCs had an amplitude of at most 31.6 pA and an IEI of at most 1.6 s whereas this median was 25.8 pA and 2.4 s at P30+. **(D)** Cumulative distributions of the rise and decay times of single NMDA sEPSCs for the two age groups (bin width 0.25 and 5 ms). The median rise and decay times were respectively 6.8 and 84.6 ms at P4–P10 and 6.6 and 71.9 ms at P30+. Number of events: 1350 (P4–P10) and 770 (P30+). In this and subsequent figures, when indicated, $^*P < 0.05$ and $^{**}P < 0.01$.

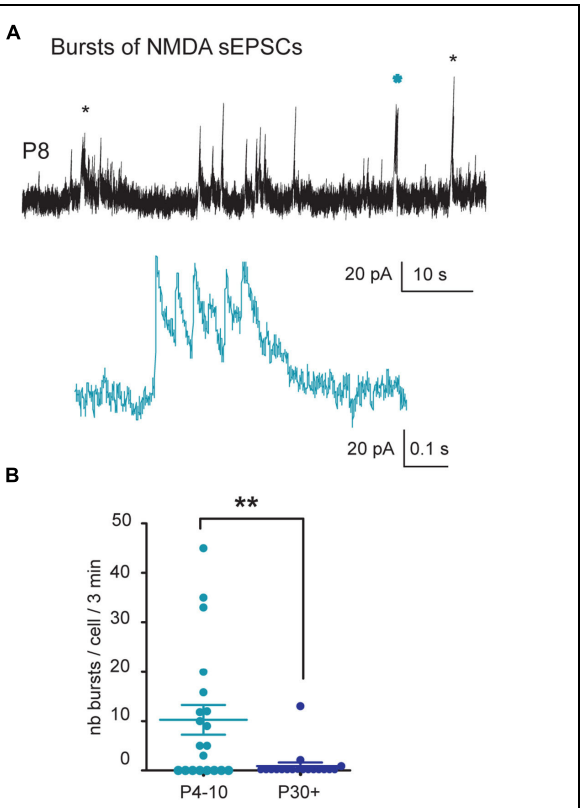


FIGURE 4 | Bursts of NMDA sEPSCs during postnatal development. (A) Voltage-clamp recordings of NMDA sEPSCs from a P8 SNc TH-GFP neuron in the continuous presence of gabazine (5 μM) and NBQX (10 μM) at $V_H = +40$ mV. The stars (black and blue) indicate bursts of NMDA sEPSCs. The other events are single events either isolated or in trains. The burst indicated by a blue star is shown in the inset at a more rapid time base. **(B)** Quantification and statistical comparison of the number of bursts per cell per 3 min from P4–P10 and P30+ SNc DA neurons. In this and subsequent figures, when indicated, $^*P < 0.05$ and $^{**}P < 0.01$.

NMDAR, abolished all single and bursting NMDA sEPSCs, in P4–P10 and P30+ SNc DA neurons (data not shown). Application of Ro 25-6981, before that of DQP 1105, also blocked all ongoing NMDA sEPSCs in both groups, demonstrating that all NMDA receptors contain NR2B subunits.

DQP 1105 had a Postsynaptic Action

To investigate whether the GluN2D-containing NMDA receptors were localized pre- or postsynaptically, we checked whether DQP 1105 (10 μM) affected the amplitude and frequency of AMPA sEPSCs in P4–P10 SNc neurons. DQP 1105 had no effect on either the mean amplitude (14.4 ± 2.6 pA before DQP vs 15.0 ± 2.9 pA after DQP, $n = 5$, $P = 1$) or the mean frequency (1.8 ± 0.8 Hz before DQP vs 2.1 ± 0.9 Hz after DQP, $n = 5$, $P = 0.19$) of AMPA sEPSCs of immature SNc neurons (data not shown). Taken together, our results demonstrate that GluN2D-containing NMDA receptors are transiently expressed at P4–P10 in SNc DA neurons and are expressed postsynaptically.

All the above results indicate that a GluN2B subunit is present in NMDARs of both immature and young adult SNc DA neurons

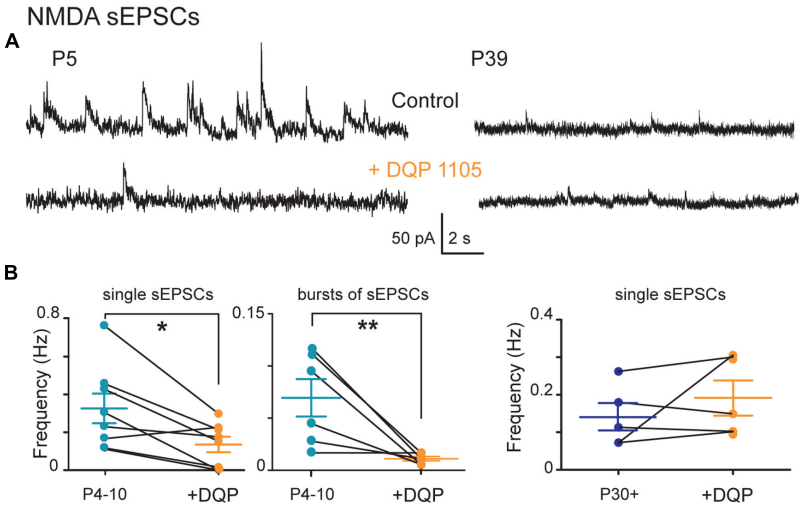


FIGURE 5 | Pharmacology of single and bursts of NMDA sEPSCs during postnatal development. (A) Voltage-clamp recordings of NMDA sEPSCs from a P5 and a P39 SNc TH-GFP neuron in the continuous presence of gabazine (5 μM) and NBQX (10 μM) at V_H = +40 mV in the absence (top) or presence (bottom) of DQP1105 (10 μM). **(B)** From left to right, quantification of the effect of DQP 1105 on the frequency of single (left) and bursts of (right) NMDA sEPSCs recorded at P4–P10. In this and subsequent figures, when indicated, $^*P < 0.05$ and $^{**}P < 0.01$.

and is indispensable for the generation of NMDA sEPSCs. In contrast, the GluN2D-containing NMDA receptor follows a developmental sequence responsible for the generation of large and frequent single sEPSCs and bursts of sEPSCs in immature SNc DA neurons. Subsequently, GluN2D subunit-containing NMDA receptor-mediated sEPSCs disappear in young adult SNc DA neurons, probably due to the disappearance of GluN2D subunit-containing receptors.

The AMPA/NMDA Ratio of Glutamatergic Receptor-Mediated EPSCs Follows a Developmental Sequence

We investigated whether a change in NMDA current during development would be evidenced by a change in AMPA/NMDA ratio. Comparison of the STN-evoked monosynaptic responses at V_H = –70 mV and +40 mV, before and after bath application of APV (40 μM), showed that at V_H = –70 mV the inward EPSC was purely mediated by AMPAR and at V_H = +40 mV, 100 ms after its onset, the outward EPSC was purely mediated by NMDAR (not shown). To obtain the AMPA/NMDA ratio, we calculated, in the each recorded neuron, the ratio of the peak amplitude of the STN-evoked inward EPSC at V_H = –70 mV and of the amplitude of the evoked outward EPSC at +40 mV, 100 ms after the EPSC onset. This gave a lower AMPA/NMDA ratio (1.6 ± 0.3, n = 13) at P4–P10 than at P30+ (10.5 ± 2.8, n = 11, P = 0.0001). Therefore, NMDA currents largely predominate in P4–P10 SNc DA neurons, in contrast to P30+ (**Figure 6**).

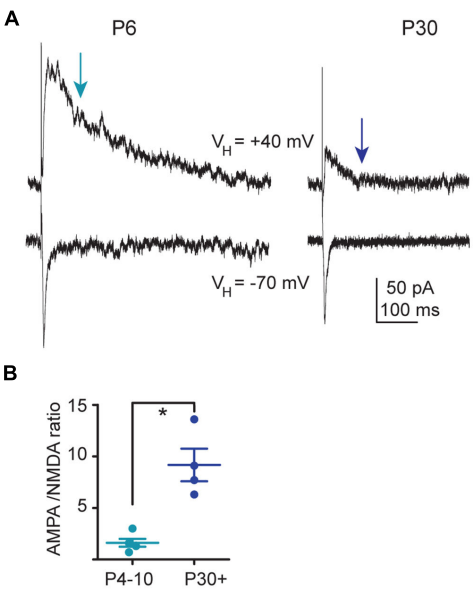


FIGURE 6 | AMPA/NMDA ratio during development. (A) Voltage clamp recordings in the same SNc TH-GFP neurons of the subthalamic nucleus (STN)-evoked AMPA EPSC (bottom traces, V_H = –70 mV) and of the STN-evoked AMPA–NMDA EPSC (top traces, V_H = +40 mV) at P6 (left) and P30 (right) in the continuous presence of gabazine (5 μM). **(B)** Statistical comparison of the ratios of the peak amplitude of the AMPA EPSC to the amplitude of the NMDA EPSC measured at t = 100 ms after the artifact (red arrow in **A**), as a function of age. In this and subsequent figures, when indicated, $^*P < 0.05$.

STN-Evoked Burst Firing of SNc DA Neurons Follows a Developmental Sequence

We stimulated STN neurons at 50 Hz (1 s duration) in sagittal slices to study the ability of SNc DA neurons to generate bursts of action potentials (Blythe et al., 2007; Hage and Khaliq, 2015). In the continuous presence of $GABA_A$ receptor antagonists, STN stimulation evoked long-lasting bursts of spikes in juvenile SNc DA neurons but not in young adult ones. At P4–P10, before

stimulation, control spike frequency was 1.58 ± 0.46 Hz (V_m = –42.2 ± 1.3 mV). The 50 Hz STN stimulation depolarized the membrane by 30% (of 12.6 ± 2.6 mV, measured at the end of the 1 s stimulation), and generated spikes at 16.7 ± 1.7 Hz (n = 16; **Figures 7A–C**). At the end of the 1 s stimulation the amplitude of the evoked action potentials was 33% smaller than that of the first spike in the train (from 63.3 ± 2.4 to 40.4 ± 3.6 mV, P = 0.0006) and their half-width 76% greater (from 3.4 ± 0.3 to 6.2 ± 0.7 ms, P < 0.0001; **Figures 7A,E**). The STN-evoked depolarization was followed by an after-depolarization which outlasted the 1s stimulation period by 623 ± 174 ms and generated spikes at 5.1 ± 1.6 Hz (n = 12/16; **Figure 7A**). Bath application of DQP (10 μM) had no significant effect on the depolarization amplitude of the evoked burst (n = 7, P > 0.99; **Figure 7D**), nor on spike frequency during the stimulation (P = 0.7) or during the after- depolarization (P = 0.8). Subsequent application of APV (40 μM) reduced the amplitude of the STN-evoked depolarization by 78% (from 11.5 ± 1.9 to 2.0 ± 0.8 mV, measured at the end of the stimulation period, P = 0.001), reduced spike frequency during the stimulation by 66% (P = 0.02) and totally abolished the after-depolarization. Subsequent application of NBQX (10 μM) totally abolished the APV-insensitive depolarization (**Figure 7D**). At P30+ (V_m = –45.2 ± 1.4 mV), the spike frequency before stimulation was 0.97 ± 0.17 Hz (not significantly different from that at P4–P10, P = 0.21). The 50 Hz STN stimulation depolarized the membrane by only 9% (3.9 ± 1.7 mV) and generated spikes at 10.1 ± 1.6 Hz (**Figures 7A,B**). The evoked depolarization never outlasted the 1 s stimulation (n = 14/14). All the above results suggest that STN stimulation evoked a larger NMDA-dependent depolarization at P4–P10 than at P30+ (P = 0.007), with a longer duration due to the presence of after-depolarization, as well as evoking spikes at a higher frequency at P4–P10 than at P30+ (P = 0.005).

Discussion

We show here that spontaneous AMPAR-mediated and NMDAR-mediated currents generated by SNc DA neurons mature over the first postnatal month. In particular, NMDA sEPSCs follow a characteristic developmental sequence. In immature compared to mature SNc neurons, NMDA sEPSCs have a greater amplitude and frequency, coupled with a characteristic bursty pattern, correlated with the transient expression of the slowly decaying, DQP 1105-sensitive, sEPSCs mediated by GluN2D subunit-containing NMDA receptors. STN-evoked bursts of spikes were also much larger in immature SNc DA neurons due to the presence of a high NMDAR-mediated component. This high NMDA activity of immature SNc DA neurons may allow the integration of synaptic inputs over longer periods, with larger calcium influxes into developing dendrites.

The dendritic tree of SNc DA neurons is already mature just after birth. In our earlier study, we found that midbrain DA neurons at late embryonic (E16–E18) and perinatal (P0–P1) stages (Ferrari et al., 2012) extend long axons that already reach the striatum at embryonic day E16, before developing their dendritic tree. Then the dendritic tree progressively matures from E16 (90 ± 31 μm total dendritic length; 1.5 ± 0.4 ends; n = 13) to P0 (1031 ± 287 μm; 12 ± 3; n = 6, P = 0.0001). When dendritic trees at P0 (Ferrari et al., 2012) were compared with dendritic trees at P4–P10 (the present study), no further maturation of dendritic length was observed (P = 0.09 Mann–Whitney test; compare Figure 1A in Ferrari et al., 2012 and **Figure 1B**). In conclusion, our results suggest that maturation of the morphological properties of the SNc DA neurons occurs during the very early prenatal period, also in agreement with previous results in the rat, where the morphology of TH positive neurons at P1 appears essentially the same as in adults (Tepper et al., 1994; Park et al., 2000).

The absence of spontaneous KAR-mediated currents in young and juvenile SNc DA neurons found here, contrasts with the large inward current previously evoked in outside-out patches of P10–P15 SNc DA neurons by bath application of KA (1 mM; Gotz et al., 1997). This suggests that the GluK1 (GluR5), GluK3 (GluR7), and GluK5 (KA2) receptor subtypes identified in rodent SNc (Bischoff et al., 1997; Wullner et al., 1997) are not activated by spontaneous release of glutamate in slices.

AMPA sEPSCs mature during the first postnatal month and display larger amplitudes in immature than in young adult SNc DA neurons. AMPAR expressed in juvenile SNc DA neurons are mainly GluA2-containing (calcium impermeable) receptors as shown by the I-V relationships in Na^+- or Ca^{2+}-enriched extracellular media (Gotz et al., 1997). Therefore synaptic activation of AMPAR is not expected to produce Ca^{2+} inflow in SNc DA neurons.

The major change during the first postnatal month concerns NMDA activity. The striking characteristic is the high spontaneous NMDA activity at P4–P10, as evidenced by large and frequent single NMDA events, sometimes with a bursty pattern, and the large APV-sensitive bursts of spikes evoked in immature but not in young adult SNc DA neurons by STN stimulation.

The spontaneous NMDA EPSCs are recorded in coronal slices where the somas of STN or PPN neurons that send glutamatergic projections to SNc DA neurons are absent. The only glutamatergic neurons [positive for the vesicular glutamate transporter type 2 (VGLuT2) mRNA] present in nigral coronal slices and that may send projections to SNc DA neurons are those described in SNc (A9) and the ventral tegmental area (VTA, A10). In contrast to VTA neurons which co-express VGluT2 mRNA and TH in a subgroup of neurons, the VGluT2 neurons in the SNc lack TH (Yamaguchi et al., 2007, 2011, 2013). This suggests that SNc and/or VTA glutamatergic neurons may connect to SNc DA neurons. Bursts of NMDA sEPSCs are likely to result from the summation of the slowly decaying NMDA sEPSCs generated by the transiently expressed, DQP 1105-sensitive, GluN2D-containing NMDA receptors (Dunah et al., 1998; Acker et al., 2011). GluN2D mRNA and protein, but not GluN2C, are preferentially expressed in the mesencephalon (Brothwell et al., 2008). Therefore the DQP-sensitive NMDA sEPSCs recorded here were mainly mediated by GluN2D subunit-containing NMDA receptors which have

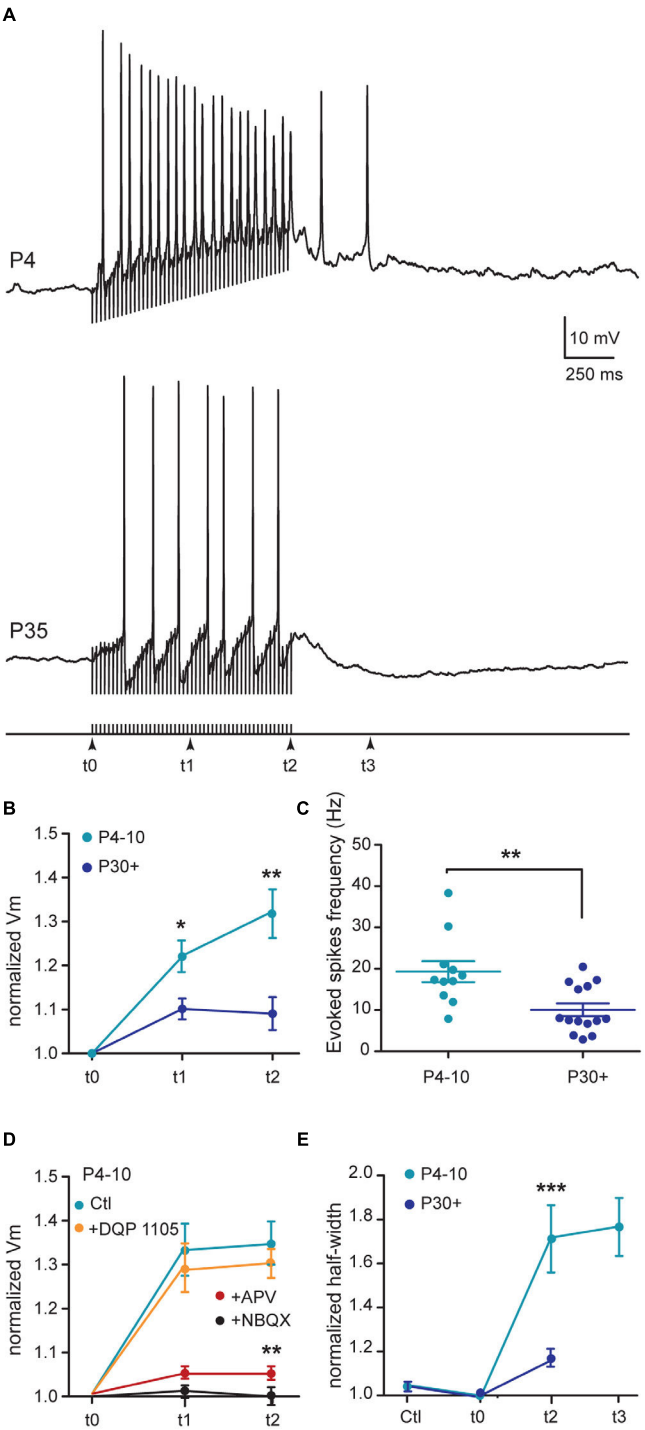


FIGURE 7 | Subthalamic nucleus-evoked responses of SNc DA neurons during development. (A) Typical examples of current clamp recordings (V_m = –43/–45 mV) of responses of SNc DA neurons to 1 s STN stimulation (200 μs stimuli at 50 Hz) in the continuous presence of gabazine (5 μM), at the indicated ages. **(B)** Quantification and statistical comparison of the percent of membrane depolarization (% ΔV_m) measured at three different times during the 50 Hz stimulation as indicated in **(A)** bottom, in P4–P10 and P30+ neurons. **(C)** Spike frequency during the stimulation period. **(D)** Normalized membrane depolarization (V_m) measured at three different times during the 50 Hz stimulation in the absence (control) and in the presence of cumulative applications of NMDAR and AMPAR blockers, as indicated (P4–P10 SNc DA neurons). **(E)** Half-width of the spike just before STN stimulation (tCtl), of the last spike evoked during the stimulation period (t2) and of the last spike evoked during the after-depolarization (t3), normalized to the half-width of the first spike at the onset of the stimulation period (t0). Spikes at t3 are absent from P30+ recordings due to the absence of after-depolarization at that age. The stars in **(B,C,E)**, indicate the statistical results between P4–P10 and P30+. The stars in **(D)** indicate the statistical results between control (Ctl) and APV, for the same age group (P4–P10). In this and subsequent figures, when indicated, $^*P < 0.05$, $^{**}P < 0.01$, and $^{***}P < 0.001$.

the slowest decay time. The deactivation time constant for the macroscopic current mediated by GluN1/GluN2D assemblies is 6–10 times slower than GluN1/GluN2B (Monyer et al., 1994; Vicini et al., 1998; Wyllie et al., 1998). This characteristic allows the summation of NMDA sEPSCs and the generation of bursts of sEPSCs. We propose that at P4–P10, NMDA sEPSCs result from the activation of diheteromeric GluN1/GluN2B receptors, together with triheteromeric GluN1/GluN2B/GluN2D receptors, (as already described in P14–P20 SNc DA neurons with exogenous NMDA application (Dunah et al., 1998; Jones and Gibb, 2005; Brothwell et al., 2008; Suarez et al., 2010; Huang and Gibb, 2014) since all NMDA sEPSCs were sensitive to Ro 25-6981, but not all were sensitive to DQP 1105.

After P30, our results suggest that SNc neurons no longer express GluN2D-containing NMDA receptors, since NMDA sEPSCs were no longer either bursty or sensitive to DQP 1105. Transient expression of the GluN2D subunit mRNA and a peak of expression around P7 are features described in midbrain regions (Monyer et al., 1994; Dunah et al., 1996; Wenzel et al., 1996; Laurie et al., 1997; Liu and Wong-Riley, 2010), suggesting that GluN2D subunit-containing NMDA receptors play a role in these brain regions mainly during development (von Engelhardt et al., 2015). Consistent with these results, we demonstrate the dynamic remodeling of NMDA receptor subunit composition in SNc DA neurons during postnatal development with GluN2D subunits no longer present in young adult mice.

The key role of NMDAR-mediated currents at P4–P10 is also revealed by the large APV-sensitive (but DQP 1105-insensitive) burst of spikes evoked by STN stimulation in immature but not in P30+ SNc DA neurons. The lack of effect of DQP 1105 might result from the absence of NR2D subunit-containing NMDAR in the postsynaptic membrane of STN–SNc synapses. It could also result from the low participation of these NMDAR subtypes to the depolarization underlying the STN-evoked burst of spikes compared to the current through NR2B subunit-containing NMDARs and voltage-dependent calcium channels. Interestingly, a similar NMDAR-dependent burst was described in the SNc of P14–P21 mice (Hage and Khaliq, 2015), suggesting that NMDA EPSCs mature after P21 and before P30. This large P4–P10 STN-evoked burst of spikes did not result from a different basal tonic firing rate before the stimulation which tunes synaptic gain in SNc DA neurons (Hage and Khaliq, 2015). During the burst, the progressive increase in the depolarization underlying the burst of spikes might result from backpropagation in the dendrites of the first spikes in the burst. These backpropagated spikes, by increasing calcium influx in dendrites, amplify the amplitude of NMDA EPSPs evoked by STN stimulation (Hage and Khaliq, 2015).

Author Contributions

EP, LAGC, FM, and RC performed the experiments. EP, LAGC, FM, and CH analyzed the data. CH designed the study and wrote the paper.

Acknowledgment

The authors acknowledge the support of the animal house facility headed by S. Pellegrino.

Supplementary Material

The Supplementary Material for this article can be found online at: http://journal.frontiersin.org/article/10.3389/fncel.2015.00210/abstract

Figure S1 | Representative confocal image of the SNc (coronal section) from a TH-GFP mouse showing TH-positive neurons labeled with Alexa A555 (left), GFP positive neurons (right) and merged image (center). Arrows show GFP-positive/TH-negative SNc neurons. Scale bar 50 μm.

References

Acker, T. M., Yuan, H., Hansen, K. B., Vance, K. M., Ogden, K. K., Jensen, H. S., et al. (2011). Mechanism for noncompetitive inhibition by novel GluN2C/D N-methyl-D-aspartate receptor subunit-selective modulators. *Mol. Pharmacol.* 80, 782–795. doi: 10.1124/mol.111.073239

Bischoff, S., Barhanin, J., Bettler, B., Mulle, C., and Heinemann, S. (1997). Spatial distribution of kainate receptor subunit mRNA in the mouse basal ganglia and ventral mesencephalon. *J. Comp. Neurol.* 379, 541–562. doi: 10.1002/(SICI)1096-9861(19970324)379:4<541::AID-CNE6>3.0.CO;2-2

Blythe, S. N., Atherton, J. F., and Bevan, M. D. (2007). Synaptic activation of dendritic AMPA and NMDA receptors generates transient high-frequency firing in substantia nigra dopamine neurons in vitro. *J. Neurophysiol.* 97, 2837–2850. doi: 10.1152/jn.01157.2006

Blythe, S. N., Wokosin, D., Atherton, J. F., and Bevan, M. D. (2009). Cellular mechanisms underlying burst firing in substantia nigra dopamine neurons. *J. Neurosci.* 29, 15531–15541. doi: 10.1523/JNEUROSCI.2961-09.2009

Brothwell, S. L., Barber, J. L., Monaghan, D. T., Jane, D. E., Gibb, A. J., and Jones, S. (2008). NR2B- and NR2D-containing synaptic NMDA receptors in developing rat substantia nigra pars compacta dopaminergic neurones. *J. Physiol.* 586, 739–750. doi: 10.1113/jphysiol.2007.144618

Bunney, B. S., Aghajanian, G. K., and Roth, R. H. (1973). Comparison of effects of L-dopa, amphetamine and apomorphine on firing rate of rat dopaminergic neurones. *Nat. New Biol.* 245, 123–125. doi: 10.1038/newbio245123a0

Calabresi, P., Picconi, B., Tozzi, A., and Di Filippo, M. (2007). Dopamine-mediated regulation of corticostriatal synaptic plasticity. *Trends Neurosci.* 30, 211–219. doi: 10.1016/j.tins.2007.03.001

Centonze, D., Picconi, B., Gubellini, P., Bernardi, G., and Calabresi, P. (2001). Dopaminergic control of synaptic plasticity in the dorsal striatum. *Eur. J. Neurosci.* 13, 1071–1077. doi: 10.1046/j.0953-816x.2001.01485.x

Chatha, B. T., Bernard, V., Streit, P., and Bolam, J. P. (2000). Synaptic localization of ionotropic glutamate receptors in the rat substantia nigra. *Neuroscience* 101, 1037–1051. doi: 10.1016/S0306-4522(00)00432-2

Chergui, K., Akaoka, H., Charlety, P. J., Saunier, C. F., Buda, M., and Chouvet, G. (1994). Subthalamic nucleus modulates burst firing of nigral dopamine neurones via NMDA receptors. *Neuroreport* 5, 1185–1188. doi: 10.1097/00001756-199406020-00006

Chergui, K., Charlety, P. J., Akaoka, H., Saunier, C. F., Brunet, J. L., Buda, M., et al. (1993). Tonic activation of NMDA receptors causes

spontaneous burst discharge of rat midbrain dopamine neurons in vivo. *Eur. J. Neurosci.* 5, 137–144. doi: 10.1111/j.1460-9568.1993.tb00479.x

Christoffersen, C. L., and Meltzer, L. T. (1995). Evidence for N-methyl-D-aspartate and AMPA subtypes of the glutamate receptor on substantia nigra dopamine neurons: possible preferential role for N-methyl-D-aspartate receptors. *Neuroscience* 67, 373–381. doi: 10.1016/0306-4522(95)00047-M

Counihan, T. J., Landwehrmeyer, G. B., Standaert, D. G., Kosinski, C. M., Scherzer, C. R., Daggett, L. P., et al. (1998). Expression of N-methyl-D-aspartate receptor subunit mRNA in the human brain: mesencephalic dopaminergic neurons. *J. Comp. Neurol.* 390, 91–101. doi: 10.1002/(SICI)1096-9861(19980105)390:1<91::AID-CNE8>3.0.CO;2-L

Deister, C. A., Teagarden, M. A., Wilson, C. J., and Paladini, C. A. (2009). An intrinsic neuronal oscillator underlies dopaminergic neuron bursting. *J. Neurosci.* 29, 15888–15897. doi: 10.1523/JNEUROSCI.4053-09.2009

Dunah, A. W., Luo, J., Wang, Y. H., Yasuda, R. P., and Wolfe, B. B. (1998). Subunit composition of N-methyl-D-aspartate receptors in the central nervous system that contain the NR2D subunit. *Mol. Pharmacol.* 53, 429–437.

Dunah, A. W., Yasuda, R. P., Wang, Y. H., Luo, J., Davila-Garcia, M., Gbadegesin, M., et al. (1996). Regional and ontogenic expression of the NMDA receptor subunit NR2D protein in rat brain using a subunit-specific antibody. *J. Neurochem.* 67, 2335–2345. doi: 10.1046/j.1471-4159.1996.67062335.x

Fa, M., Mereu, G., Ghiglieri, V., Meloni, A., Salis, P., and Gessa, G. L. (2003). Electrophysiological and pharmacological characteristics of nigral dopaminergic neurons in the conscious, head-restrained rat. *Synapse* 48, 1–9. doi: 10.1002/syn.10177

Falkenburger, B. H., Barstow, K. L., and Mintz, I. M. (2001). Dendrodendritic inhibition through reversal of dopamine transport. *Science* 293, 2465–2470. doi: 10.1126/science.1060645

Ferrari, D. C., Mdzomba, B. J., Dehorter, N., Lopez, C., Michel, F. J., Libersat, F., et al. (2012). Midbrain dopaminergic neurons generate calcium and sodium currents and release dopamine in the striatum of pups. *Front. Cell. Neurosci.* 6:7. doi: 10.3389/fncel.2012.00007

Futami, T., Takakusaki, K., and Kitai, S. T. (1995). Glutamatergic and cholinergic inputs from the pedunculopontine tegmental nucleus to dopamine neurons in the substantia nigra pars compacta. *Neurosci. Res.* 21, 331–342. doi: 10.1016/0168-0102(94)00869-H

Gentet, L. J., and Williams, S. R. (2007). Dopamine gates action potential backpropagation in midbrain dopaminergic neurons. *J. Neurosci.* 27, 1892–1901. doi: 10.1523/JNEUROSCI.5234-06.2007

Gonon, F. G. (1988). Nonlinear relationship between impulse flow and dopamine released by rat midbrain dopaminergic neurons as studied by in vivo electrochemistry. *Neuroscience* 24, 19–28. doi: 10.1016/0306-4522(88)90307-7

Gotz, T., Kraushaar, U., Geiger, J., Lubke, J., Berger, T., and Jonas, P. (1997). Functional properties of AMPA and NMDA receptors expressed in identified types of basal ganglia neurons. *J. Neurosci.* 17, 204–215.

Grace, A. A., and Bunney, B. S. (1983). Intracellular and extracellular electrophysiology of nigral dopaminergic neurons–2. Action potential generating mechanisms and morphological correlates. *Neuroscience* 10, 317–331. doi: 10.1016/0306-4522(83)90136-7

Grace, A. A., and Bunney, B. S. (1984a). The control of firing pattern in nigral dopamine neurons: burst firing. *J. Neurosci.* 4, 2877–2890.

Grace, A. A., and Bunney, B. S. (1984b). The control of firing pattern in nigral dopamine neurons: single spike firing. *J. Neurosci.* 4, 2866–2876.

Grace, A. A., and Onn, S. P. (1989). Morphology and electrophysiological properties of immunocytochemically identified rat dopamine neurons recorded in vitro. *J. Neurosci.* 9, 3463–3481.

Grillner, P., and Mercuri, N. B. (2002). Intrinsic membrane properties and synaptic inputs regulating the firing activity of the dopamine neurons. *Behav. Brain Res.* 130, 149–169. doi: 10.1016/S0166-4328(01)00418-1

Gulacsi, A., Lee, C. R., Sik, A., Viitanen, T., Kaila, K., Tepper, J. M., et al. (2003). Cell type-specific differences in chloride-regulatory mechanisms and GABA(A) receptor-mediated inhibition in rat substantia nigra. *J. Neurosci.* 23, 8237–8246.

Hage, T. A., and Khaliq, Z. M. (2015). Tonic firing rate controls dendritic Ca^{2+} signaling and synaptic gain in substantia nigra dopamine neurons. *J. Neurosci.* 35, 5823–5836. doi: 10.1523/JNEUROSCI.3904-14.2015

Hammond, C., Deniau, J. M., Rizk, A., and Féger, J. (1978). Electrophysiological demonstration of an excitatory subthalamonigral pathway in the rat. *Brain Res.* 151, 235–244. doi: 10.1016/0006-8993(78)90881-8

Hausser, M., Stuart, G., Racca, C., and Sakmann, B. (1995). Axonal initiation and active dendritic propagation of action potentials in substantia nigra neurons. *Neuron* 15, 637–647. doi: 10.1016/0896-6273(95)90152-3

Huang, Z., and Gibb, A. J. (2014). Mg^{2+} block properties of triheteromeric GluN1-GluN2B-GluN2D NMDA receptors on neonatal rat substantia nigra pars compacta dopaminergic neurones. *J. Physiol.* 592, 2059–2078. doi: 10.1113/jphysiol.2013.267864

Hyland, B. I., Reynolds, J. N., Hay, J., Perk, C. G., and Miller, R. (2002). Firing modes of midbrain dopamine cells in the freely moving rat. *Neuroscience* 114, 475–492. doi: 10.1016/S0306-4522(02)00267-1

Jackson, A., and Crossman, A. R. (1983). Nucleus tegmenti pedunculopontinus: efferent connections with special reference to the basal ganglia, studied in the rat by anterograde and retrograde transport of horseradish peroxidase. *Neuroscience* 10, 725–765. doi: 10.1016/0306-4522(83)90213-0

Johnson, S. W., Seutin, V., and North, R. A. (1992). Burst firing in dopamine neurons induced by N-methyl-D-aspartate: role of electrogenic sodium pump. *Science* 258, 665–667. doi: 10.1126/science.1329209

Jones, S., and Gibb, A. J. (2005). Functional NR2B- and NR2D-containing NMDA receptor channels in rat substantia nigra dopaminergic neurons. *J. Physiol.* 569, 209–221. doi: 10.1113/jphysiol.2005.095554

Kreitzer, A. C., and Malenka, R. C. (2008). Striatal plasticity and basal ganglia circuit function. *Neuron* 60, 543–554. doi: 10.1016/j.neuron.2008.11.005

Laurie, D. J., Schoeffter, P., Wiederhold, K. H., and Sommer, B. (1997). Cloning, distribution and functional expression of the human mGlu6 metabotropic glutamate receptor. *Neuropharmacology* 36, 145–152. doi: 10.1016/S0028-3908(96)00172-4

Lin, J. Y., and Lipski, J. (2001). Dopaminergic substantia nigra neurons express functional nmda receptors in postnatal rats. *J. Neurophysiol.* 85, 1336–1339.

Liu, Q., and Wong-Riley, M. T. (2010). Postnatal development of N-methyl-D-aspartate receptor subunits 2A, 2B, 2C, 2D, and 3B immunoreactivity in brain stem respiratory nuclei of the rat. *Neuroscience* 171, 637–654. doi: 10.1016/j.neuroscience.2010.09.055

Manley, L. D., Kuczenski, R., Segal, D. S., Young, S. J., and Groves, P. M. (1992). Effects of frequency and pattern of medial forebrain bundle stimulation on caudate dialysate dopamine and serotonin. *J. Neurochem.* 58, 1491–1498. doi: 10.1111/j.1471-4159.1992.tb11369.x

Matsushita, N., Okada, H., Yasoshima, Y., Takahashi, K., Kiuchi, K., and Kobayashi, K. (2002). Dynamics of tyrosine hydroxylase promoter activity during midbrain dopaminergic neuron development. *J. Neurochem.* 82, 295–304. doi: 10.1046/j.1471-4159.2002.00972.x

Meltzer, L. T., Christoffersen, C. L., and Serpa, K. A. (1997). Modulation of dopamine neuronal activity by glutamate receptor subtypes. *Neurosci. Biobehav. Rev.* 21, 511–518. doi: 10.1016/S0149-7634(96)00030-9

Mereu, G., Costa, E., Armstrong, D. M., and Vicini, S. (1991). Glutamate receptor subtypes mediate excitatory synaptic currents of dopamine neurons in midbrain slices. *J. Neurosci.* 11, 1359–1366.

Mereu, G., Lilliu, V., Casula, A., Vargiu, P. F., Diana, M., Musa, A., et al. (1997). Spontaneous bursting activity of dopaminergic neurons in midbrain slices from immature rats: role of N-methyl-D-aspartate receptors. *Neuroscience* 77, 1029–1036. doi: 10.1016/S0306-4522(96)00474-5

Monyer, H., Burnashev, N., Laurie, D. J., Sakmann, B., and Seeburg, P. H. (1994). Developmental and regional expression in the rat brain and functional properties of four NMDA receptors. *Neuron* 12, 529–540. doi: 10.1016/0896-6273(94)90210-0

Paladini, C. A., and Roeper, J. (2014). Generating bursts (and pauses) in the dopamine midbrain neurons. *Neuroscience* 282C, 109–121. doi: 10.1016/j.neuroscience.2014.07.032

Park, M., Kitahama, K., Geffard, M., and Maeda, T. (2000). Postnatal development of the dopaminergic neurons in the rat mesencephalon. *Brain Dev.* 22(Suppl. 1), S38–S44. doi: 10.1016/S0387-7604(00)00145-5

Reynolds, J. N., and Wickens, J. R. (2000). Substantia nigra dopamine regulates synaptic plasticity and membrane potential fluctuations in the rat neostriatum, in vivo. *Neuroscience* 99, 199–203. doi: 10.1016/S0306-4522(00)00273-6

Richards, C. D., Shiroyama, T., and Kitai, S. T. (1997). Electrophysiological and immunocytochemical characterization of GABA and dopamine neurons in the substantia nigra of the rat. *Neuroscience* 80, 545–557. doi: 10.1016/S0306-4522(97)00093-6

Rinvik, E., and Ottersen, O. P. (1993). Terminals of subthalamonigral fibres are enriched with glutamate-like immunoreactivity: an electron microscopic, immunogold analysis in the cat. *J. Chem. Neuroanat.* 6, 19–30. doi: 10.1016/0891-0618(93)90004-N

Rye, D. B., Saper, C. B., Lee, H. J., and Wainer, B. H. (1987). Pedunculopontine tegmental nucleus of the rat: cytoarchitecture, cytochemistry, and some extrapyramidal connections of the mesopontine tegmentum. *J. Comp. Neurol.* 259, 483–528. doi: 10.1002/cne.902590403

Scarnati, E., Campana, E., and Pacitti, C. (1984). Pedunculopontine-evoked excitation of substantia nigra neurons in the rat. *Brain Res.* 304, 351–361. doi: 10.1016/0006-8993(84)90339-1

Schultz, W. (2013). Updating dopamine reward signals. *Curr. Opin. Neurobiol.* 23, 229–238. doi: 10.1016/j.conb.2012.11.012

Smith, I. D., and Grace, A. A. (1992). Role of the subthalamic nucleus in the regulation of nigral dopamine neuron activity. *Synapse* 12, 287–303. doi: 10.1002/syn.890120406

Suarez, F., Zhao, Q., Monaghan, D. T., Jane, D. E., Jones, S., and Gibb, A. J. (2010). Functional heterogeneity of NMDA receptors in rat substantia nigra pars compacta and reticulata neurones. *Eur. J. Neurosci.* 32, 359–367. doi: 10.1111/j.1460-9568.2010.07298.x

Takakusaki, K., Shiroyama, T., Yamamoto, T., and Kitai, S. T. (1996). Cholinergic and noncholinergic tegmental pedunculopontine projection neurons in rats revealed by intracellular labeling. *J. Comp. Neurol.* 371, 345–361. doi: 10.1002/(SICI)1096-9861(19960729)371:3<345::AID-CNE1>3.0.CO;2-2

Tepper, J. M., Damlama, M., and Trent, F. (1994). Postnatal changes in the distribution and morphology of rat substantia nigra dopaminergic neurons. *Neuroscience* 60, 469–477. doi: 10.1016/0306-4522(94)90258-5

Vicini, S., Wang, J. F., Li, J. H., Zhu, W. J., Wang, Y. H., Luo, J. H., et al. (1998). Functional and pharmacological differences between recombinant N-methyl-D-aspartate receptors. *J. Neurophysiol.* 79, 555–566.

Vivo, M., Camon, L., de, V. N., and Martinez, E. (2002). Lesion of substantia nigra pars compacta by the GluR5 agonist ATPA. *Brain Res.* 955, 104–114. doi: 10.1016/S0006-8993(02)03373-5

von Engelhardt, E. J., Bocklisch, C., Tonges, L., Herb, A., Mishina, M., and Monyer, H. (2015). GluN2D-containing NMDA receptors-mediate synaptic currents in hippocampal interneurons and pyramidal cells in juvenile mice. *Front. Cell. Neurosci.* 9:95. doi: 10.3389/fncel.2015.00095

Wang, L. P., Li, F., Wang, D., Xie, K., Wang, D., Shen, X., et al. (2011). NMDA receptors in dopaminergic neurons are crucial for habit learning. *Neuron* 72, 1055–1066. doi: 10.1016/j.neuron.2011.10.019

Wenzel, A., Villa, M., Mohler, H., and Benke, D. (1996). Developmental and regional expression of NMDA receptor subtypes containing the NR2D subunit in rat brain. *J. Neurochem.* 66, 1240–1248. doi: 10.1046/j.1471-4159.1996.66031240.x

Wise, R. A. (2004). Dopamine, learning and motivation. *Nat. Rev. Neurosci.* 5, 483–494. doi: 10.1038/nrn1406

Wullner, U., Standaert, D. G., Testa, C. M., Penney, J. B., and Young, A. B. (1997). Differential expression of kainate receptors in the basal ganglia of the developing and adult rat brain. *Brain Res.* 768, 215–223. doi: 10.1016/S0006-8993(97)00645-8

Wyllie, D. J., Behe, P., and Colquhoun, D. (1998). Single-channel activations and concentration jumps: comparison of recombinant NR1a/NR2A and NR1a/NR2D NMDA receptors. *J. Physiol.* 510(Pt 1), 1–18. doi: 10.1111/j.1469-7793.1998.001bz.x

Yamaguchi, T., Sheen, W., and Morales, M. (2007). Glutamatergic neurons are present in the rat ventral tegmental area. *Eur. J. Neurosci.* 25, 106–118. doi: 10.1111/j.1460-9568.2006.05263.x

Yamaguchi, T., Wang, H. L., Li, X., Ng, T. H., and Morales, M. (2011). Mesocorticolimbic glutamatergic pathway. *J. Neurosci.* 31, 8476–8490. doi: 10.1523/JNEUROSCI.1598-11.2011

Yamaguchi, T., Wang, H. L., and Morales, M. (2013). Glutamate neurons in the substantia nigra compacta and retrorubral field. *Eur. J. Neurosci.* 38, 3602–3610. doi: 10.1111/ejn.12359

Yung, W. H., Hausser, M. A., and Jack, J. J. (1991). Electrophysiology of dopaminergic and non-dopaminergic neurones of the guinea-pig substantia nigra pars compacta in vitro. *J. Physiol.* 436, 643–667. doi: 10.1113/jphysiol.1991.sp018571

Zweifel, L. S., Parker, J. G., Lobb, C. J., Rainwater, A., Wall, V. Z., Fadok, J. P., et al. (2009). Disruption of NMDAR-dependent burst firing by dopamine neurons provides selective assessment of phasic dopamine-dependent behavior. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 106, 7281–7288. doi: 10.1073/pnas.0813415106

Conflict of Interest Statement: 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.

Copyright © 2015 Pearlstein, Gouty-Colomer, Michel, Cloarec and Hammond. 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) or licensor 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.

REFERENCES

Adler, B. & Sinzger, C., 2009. Endothelial cells in human cytomegalovirus infection: One host cell out of many or a crucial target for virus spread? *Thrombosis and Haemostasis*, 102(6), pp.1057–1063.

Ahlfors, K., Ivarsson, S. a & Bjerre, I., 1986. Microcephaly and congenital cytomegalovirus infection: a combined prospective and retrospective study of a Swedish infant population. *Pediatrics*, 78(6), pp.1058–1063.

Ajami, B. et al., 2007. Local self-renewal can sustain CNS microglia maintenance and function throughout adult life. *Nature neuroscience*, 10(12), pp.1538–1543.

Alan S. Brown, M.D., M.P.H. and Elena J. Derkits, B.A., 2010. Prenatal infection and schizophrenia : a review of epidemiologic and translational studies. *American Journal of Psychiatry*, 167(3), pp.261–280.

Ali, I., Chugh, D. & Ekdahl, C.T., 2015. Role of fractalkine–CX3CR1 pathway in seizure-induced microglial activation, neurodegeneration, and neuroblast production in the adult rat brain. *Neurobiology of Disease*, 74, pp.194–203. Available at: http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0969996114003477.

Aloisi, F. et al., 1992. Production of hemolymphopoietic cytokines (IL-6, IL-8, colony-stimulating factors) by normal human astrocytes in response to IL-1 beta and tumor necrosis factor-alpha. *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)*, 149(7), pp.2358–2366.

Alvarado, J.C. et al., 2014. Wistar rats: a forgotten model of age-related hearing loss. *Frontiers in Aging Neuroscience*, 6(March), pp.1–20. Available at: http://journal.frontiersin.org/article/10.3389/fnagi.2014.00029/abstract.

Amy E. Baxter, 1, 2, 3, 9 Rebecca A. Russell, 1, 9 Christopher J.A. Duncan, 1, 9 Michael D. Moore, 1 Christian B. Willberg, 4 Jose L. Pablos, 5 Andre´s Finzi, 3, 6 Daniel E. Kaufmann, 2, 3, 7 Christina Ochsenbauer, 8 John C. Kappes, 8 Fedde Groot, 1, 10, 2014. Macrophage Infection via Selective Capture of HIV-1-Infected CD4+ TCells. , pp.711–721.

Anthony N. van den Pol, 2009. Viral infection leading to brain dysfunction: more prevalent than appreciated. *Neuron*, 64(1), pp.17–20.

Arnoux, I. et al., 2014. Paradoxical effects of minocycline in the developing mouse somatosensory cortex. *Glia*, 62(3), pp.399–410. Available at: http://doi.wiley.com/10.1002/glia.22612.

Avignone, E., Ulmann, L. & Inserm, U., 2008. Status Epilepticus Induces a Particular Microglial Activation State Characterized by Enhanced Purinergic Signaling. , 28(37), pp.9133–9144.

Baca Jones, C.C. et al., 2009. Rat cytomegalovirus infection depletes MHC II in bone marrow derived dendritic cells. *Virology*, 388(1), pp.78–90. Available at: http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=2749604&tool=pmcentrez&rendertype=abstract [Accessed October 13, 2011].

Bale, J.F., 2015. Virus and Immune-Mediated Encephalitides: Epidemiology, Diagnosis, Treatment, and Prevention. *Pediatric Neurology*, 53(1), pp.3–12. Available at:

http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0887899415001526.

Bantug, G.R.B. et al., 2008. CD8+ T lymphocytes control murine cytomegalovirus replication in the central nervous system of newborn animals. *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)*, 181(3), pp.2111–23. Available at: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18641350.

Barkovich, a. J. & Girard, N., 2003. Fetal brain infections. *Child's Nervous System*, 19(7-8), pp.501–507.

Barkovich, A.J., 2010. Current concepts of polymicrogyria. *Neuroradiology*, 52(6), pp.479–87. Available at: http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=2872023&tool=pmcentrez&rendertype=abstract.

Barkovich, A.J. & Lindan, C.E., Congenital cytomegalovirus infection of the brain: imaging analysis and embryologic considerations. *AJNR Am.J.Neuroradiol.*, 15(4), pp.703–715.

Bayer, C. et al., 2013. Human Cytomegalovirus Infection of M1 and M2 Macrophages Triggers Inflammation and Autologous T-Cell Proliferation. *Journal of Virology*, 87(1), pp.67–79. Available at: http://jvi.asm.org/cgi/doi/10.1128/JVI.01585-12.

Bazinet, R.P. & Layé, S., 2014. Polyunsaturated fatty acids and their metabolites in brain function and disease. *Nature reviews. Neuroscience*, 15(12), pp.771–785. Available at: http://dx.doi.org/10.1038/nrn3820.

Bechmann, I. et al., 2001. Turnover of rat brain perivascular cells. *Experimental neurology*, 168(2), pp.242–249.

Bennetto, L. & Scolding, N., 2004. Inflammatory/post-infectious encephalomyelitis. *Journal of neurology, neurosurgery, and psychiatry*, 75 Suppl 1, pp.i22–i28.

Bentz, G.L. et al., 2006. Human cytomegalovirus (HCMV) infection of endothelial cells promotes naive monocyte extravasation and transfer of productive virus to enhance hematogenous dissemination of HCMV. *Journal of virology*, 80(23), pp.11539–55. Available at: http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=1642592&tool=pmcentrez&rendertype=abstract [Accessed January 6, 2014].

Bergmann, C.C., Lane, T.E. & Stohlman, S. a, 2006. Coronavirus infection of the central nervous system: host-virus stand-off. *Nature reviews. Microbiology*, 4(2), pp.121–132.

Bialas, K.M. et al., 2015. Maternal CD4 $^{+}$ T cells protect against severe congenital cytomegalovirus disease in a novel nonhuman primate model of placental cytomegalovirus transmission. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, p.201511526. Available at: http://www.pnas.org/lookup/doi/10.1073/pnas.1511526112.

Boksa, P., 2010. Effects of prenatal infection on brain development and behavior: A review of findings from animal models. *Brain, Behavior, and Immunity*, 24(6), pp.881–897.

Bonalumi, S. et al., 2011. Cytomegalovirus infection in pregnancy: review of the literature. *Journal of prenatal medicine*, 5(1), pp.1–8. Available at:

http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=3279147&tool=pmcentrez&rendertype=abstract.

Bonthius, D.J. et al., 2007. Lymphocytic choriomeningitis virus infection of the developing brain: Critical role of host age. *Annals of Neurology*, 62(4), pp.356–374.

Boppana, S.B., Ross, S. a & Fowler, K.B., 2013. Congenital cytomegalovirus infection: clinical outcome. *Clin Infect Dis*, 57 Suppl 4(Suppl 4), pp.S178–81.

Borregaard, N., 2010. Neutrophils, from Marrow to Microbes. *Immunity*, 33(5), pp.657–670. Available at: http://dx.doi.org/10.1016/j.immuni.2010.11.011.

Borrell, J. et al., 2002. Prenatal immune challenge disrupts sensorimotor gating in adult rats: Implications for the etiopathogenesis of schizophrenia. *Neuropsychopharmacology*, 26(2), pp.204–215.

Boyer, F.C. et al., 2010. Post-polio syndrome: Pathophysiological hypotheses, diagnosis criteria, medication therapeutics. *Annals of Physical and Rehabilitation Medicine*, 53(1), pp.34–41.

Bradford, R.D. et al., 2015. Murine CMV-Induced Hearing Loss Is Associated with Inner Ear Inflammation and Loss of Spiral Ganglia Neurons. *PLOS Pathogens*, 11(4), p.e1004774. Available at: http://dx.plos.org/10.1371/journal.ppat.1004774.

Bratcher, D.F. et al., 1995. Effect of passive antibody on congenital cytomegalovirus infection in guinea pigs. *The Journal of infectious diseases*, 172(4), pp.944–950.

Bri, U.N.E. & Revue, V.E., 1991. H U M O R A L I M M U N E RESPONSE TO H U M A N C Y T O M E G A L O V I R U S PROTEINS : A BRIEF REVIEW. , 14(2), pp.97–105.

Browne, T.C. et al., 2013. IFN-γ Production by amyloid β-specific Th1 cells promotes microglial activation and increases plaque burden in a mouse model of Alzheimer's disease. *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)*, 190(5), pp.2241–51. Available at: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23365075.

Burguillos, M.A. et al., 2011. Caspase signalling controls microglia activation and neurotoxicity. *Nature*, 472(7343), pp.319–324. Available at: http://www.nature.com/doifinder/10.1038/nature09788.

Butchi, N.B. et al., 2011. TLR7 and TLR9 trigger distinct neuroinflammatory responses in the CNS. *American Journal of Pathology*, 179(2), pp.783–794.

Buxmann, H. et al., 2012. Use of cytomegalovirus hyperimmunoglobulin for prevention of congenital cytomegalovirus disease: A retrospective analysis. *Journal of Perinatal Medicine*, 40(4), pp.439–446.

Canetta, S.E. et al., 2014. Serological documentation of maternal influenza exposure and bipolar disorder in adult offspring. *American Journal of Psychiatry*, 171(5), pp.557–563.

Caraballo, R.H. et al., 2009. Benign infantile seizures with mild gastroenteritis: study of 22 patients. *Seizure : the journal of the British Epilepsy Association*, 18(10), pp.686–9. Available at: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19828335.

Casiraghi, C., Dorovini-Zis, K. & Horwitz, M.S., 2011. Epstein-Barr virus infection of human brain microvessel endothelial cells: A novel role in multiple sclerosis. *Journal of Neuroimmunology*, 230(1-2), pp.173–177. Available at: http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0165572810003474.

Chai, Q. et al., 2014. Enhancement of blood-brain barrier permeability and reduction of tight junction protein expression are modulated by chemokines/cytokines induced by rabies virus infection. *Journal of virology*, 88(9), pp.4698–710. Available at: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24522913.

Chan, G. et al., 2008. Transcriptome Analysis Reveals Human Cytomegalovirus Reprograms Monocyte Differentiation toward an M1 Macrophage. *The Journal of Immunology*, 181(1), pp.698–711. Available at: http://www.jimmunol.org/cgi/doi/10.4049/jimmunol.181.1.698.

Chan, G., Nogalski, M.T. & Yurochko, A.D., 2012. Human cytomegalovirus stimulates monocyte-to-macrophage differentiation via the temporal regulation of caspase 3. *Journal of virology*, 86(19), pp.10714–23. Available at: http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=3457328&tool=pmcentrez&rendertype=abstract [Accessed January 6, 2014].

Chatterjee, a et al., 2001. Modification of maternal and congenital cytomegalovirus infection by anti-glycoprotein b antibody transfer in guinea pigs. *The Journal of infectious diseases*, 183(11), pp.1547–1553.

Cheeran, M.C. et al., 2001. Cytomegalovirus induces cytokine and chemokine production differentially in microglia and astrocytes: antiviral implications. *Journal of neurovirology*, 7(2), pp.135–47. Available at: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11517386.

Cheeran, M.C. et al., 2000. Decreased Cytomegalovirus Expression Following Proinflammatory Cytokine Treatment of Primary Human Astrocytes 1. , pp.0–7.

Cheeran, M.C.J. et al., 2005. Neural precursor cell susceptibility to human cytomegalovirus diverges along glial or neuronal differentiation pathways. *Journal of Neuroscience Research*, 82(6), pp.839–850.

Cheeran, M.C.-J. et al., 2003. CXCL10 production from cytomegalovirus-stimulated microglia is regulated by both human and viral interleukin-10. *Journal of virology*, 77(8), pp.4502–15. Available at: http://jvi.asm.org/content/77/8/4502.short [Accessed June 4, 2014].

Cheeran, M.C.-J. et al., 2008. Cytomegalovirus infection and interferon-γ modulate major histocompatibility complex class I expression on neural stem cells. *Journal of Neurovirology*, 14(5), pp.437–447.

Cheeran, M.C.-J. et al., 2007. Dysregulated interferon-gamma responses during lethal cytomegalovirus brain infection of IL-10-deficient mice. *Virus Research*, 130(1-2), pp.96–102. Available at: http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0168170207002134.

Cheeran, M.C.-J. et al., 2005. T cell–mediated restriction of intracerebral murine cytomegalovirus infection displays dependence upon perforin but not interferon-γ. *Journal of Neurovirology*, 11(3), pp.274–280. Available at:

http://link.springer.com/10.1080/13550280590952808.

Cheeran, M.C.-J., Lokensgard, J.R. & Schleiss, M.R., 2009b. Neuropathogenesis of congenital cytomegalovirus infection: disease mechanisms and prospects for intervention. *Clinical microbiology reviews*, 22(1), pp.99–126, Table of Contents. Available at: http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=2620634&tool=pmcentrez&rendertype=abstract [Accessed July 13, 2011].

Cheeran, M.C.-J., Lokensgard, J.R. & Schleiss, M.R., 2009a. Neuropathogenesis of congenital cytomegalovirus infection: disease mechanisms and prospects for intervention. *Clinical microbiology reviews*, 22(1), pp.99–126, Table of Contents. Available at: http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=2620634&tool=pmcentrez&rendertype=abstract [Accessed January 6, 2014].

Chen, B.P., Kuziel, W. a. & Lane, T.E., 2001. Lack of CCR2 Results in Increased Mortality and Impaired Leukocyte Activation and Trafficking Following Infection of the Central Nervous System with a Neurotropic Coronavirus. *The Journal of Immunology*, 167(8), pp.4585–4592. Available at: http://www.jimmunol.org/cgi/doi/10.4049/jimmunol.167.8.4585.

Chen, B.P. & Lane, T.E., 2002. Lack of nitric oxide synthase type 2 (NOS2) results in reduced neuronal apoptosis and mortality following mouse hepatitis virus infection of the central nervous system. *J Neurovirol*, 8(1), pp.58–63. Available at: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11847593.

Cheung, A.K.L. et al., 2006. Viral gene expression during the establishment of human cytomegalovirus latent infection in myeloid progenitor cells. *Gene Expression*, 108(12), pp.3691–3699.

Clay, C.C. et al., 2007. Neuroinvasion of fluorescein-positive monocytes in acute simian immunodeficiency virus infection. *Journal of virology*, 81(21), pp.12040–12048.

Cleef, K. van, 2007. Molecular biology of rat cytomegalovirus: genome-wide transcriptional program and molecular mimicry. Available at: http://arno.unimaas.nl/show.cgi?fid=7931 [Accessed June 29, 2012].

Clemente, D. et al., 2013. The effect of glia-glia interactions on oligodendrocyte precursor cell biology during development and in demyelinating diseases. *Frontiers in cellular neuroscience*, 7(December), p.268. Available at: http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=3868919&tool=pmcentrez&rendertype=abstract.

Cloarec, R. et al., 2012. PRRT2 links infantile convulsions and paroxysmal dyskinesia with migraine. *Neurology*, 79(21), pp.2097–103. Available at: http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=3511924&tool=pmcentrez&rendertype=abstract.

Coats, D.K. et al., 2000. Ophthalmologic findings in children with congenital cytomegalovirus infection. *Journal of AAPOS : the official publication of the American Association for Pediatric Ophthalmology and Strabismus / American Association for Pediatric*

Ophthalmology and Strabismus, 4(2), pp.110–116.

Corbacella, E. et al., 2004. Minocycline attenuates gentamicin induced hair cell loss in neonatal cochlear cultures. *Hearing Research*, 197(1-2), pp.11–18. Available at: http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0378595504001224.

Cotin, S. et al., 2012. Eight flavonoids and their potential as inhibitors of human cytomegalovirus replication. *Antiviral Research*, 96(2), pp.181–186. Available at: http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0166354212002070.

Cradock-watson, J.E. & Pollock, T.M., 1982. CONSEQUENCES OF CONFIRMED MATERNAL RUBELLA AT SUCCESSIVE STAGES OF PREGNANCY. *Archives of Disease in Childhood*, (October).

Crane, M.J., Hokeness-Antonelli, K.L. & Salazar-Mather, T.P., 2009. Regulation of inflammatory monocyte/macrophage recruitment from the bone marrow during murine cytomegalovirus infection: role for type I interferons in localized induction of CCR2 ligands. *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)*, 183(4), pp.2810–7. Available at: http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=2911023&tool=pmcentrez&rendertype=abstract [Accessed January 6, 2014].

Crough, T. & Khanna, R., 2009. Immunobiology of human cytomegalovirus: from bench to bedside. *Clinical microbiology reviews*, 22(1), pp.76–98, Table of Contents.

Crow, T.J., 1978. Viral causes of psychiatric disease. *postgraduate medical journal*, 00(November), pp.1–4.

Crow, Y.J. et al., 2006. Mutations in genes encoding ribonuclease H2 subunits cause Aicardi-Goutières syndrome and mimic congenital viral brain infection. *Nature genetics*, 38(8), pp.910–6. Available at: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16845400 [Accessed July 6, 2011].

Cunha, B. a, 2000. Minocycline versus Doxycycline in the Treatment of Lyme Neuroborreliosis. *Clinical Infectious Diseases*, 30, pp.237–237.

Cunningham, C., 2013. Microglia regulate the number of neural precursor cells in the developing cerebral cortex. *The Journal of …*, 33(10), pp.4216–4233. Available at: http://www.jneurosci.org/content/33/10/4216.short [Accessed January 16, 2014].

Curanovic, D. & Enquist, L., 2009. Directional transneuronal spread of α-herpesvirus infection. *Future Virology*, 4(6), pp.591–603. Available at: http://www.futuremedicine.com/doi/abs/10.2217/fvl.09.62.

Dakovic, I. et al., 2014. Clinical features of cerebral palsy in children with symptomatic congenital cytomegalovirus infection. , 8, pp.6–11.

Daley-Bauer, L.P. et al., 2014. Cytomegalovirus hijacks CX3CR1(hi) patrolling monocytes as immune-privileged vehicles for dissemination in mice. *Cell host & microbe*, 15(3), pp.351–62. Available at: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24629341 [Accessed June 21, 2014].

Davalos, D. et al., 2005. ATP mediates rapid microglial response to local brain injury in vivo. *Nature neuroscience*, 8(6), pp.752–758.

Davison, K.L. & Ramsay, M.E., 2003. The epidemiology of acute meningitis in children in England and Wales. *Archives of disease in childhood*, 88(8), pp.662–664.

Diefenbach, R.J. et al., 2008. Transport and egress of herpes simplex virus in neurons. *Reviews in Medical Virology*, 18(1), pp.35–51. Available at: http://doi.wiley.com/10.1002/rmv.560.

Diego, S. et al., 2003. EFFECT OF GANCICLOVIR THERAPY ON HEARING IN SYMPTOMATIC CONGENITAL CYTOMEGALOVIRUS DISEASE INVOLVING THE CENTRAL NERVOUS SYSTEM: A RANDOMIZED, CONTROLLED TRIAL. *Pediatrics*, 143(1), pp.16–25.

Dietrich, J. et al., 2004. Infection with an endemic human herpesvirus disrupts critical glial precursor cell properties. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience*, 24(20), pp.4875–4883.

Dietzschold, B. et al., 2008. Concepts in the pathogenesis of rabies. *Future Virology*, 3(5), pp.481–490.

Dollard, S.C., Grosse, S.D. & Ross, D.S., 2007. New estimates of the prevalence of neurological and sensory sequelae and mortality associated with congenital cytomegalovirus infection. *Reviews in Medical Virology*, 17(5), pp.355–363. Available at: http://doi.wiley.com/10.1002/rmv.544.

Don Gilden, Randall J. Cohrs, Ravi Mahalingam, and M.A.N., 2010. Neurological Disease Produced by Varicella Zoster Virus Reactivation Without Rash. *Current topics in microbiology and immunology*, 342, pp.243–253.

Dreher, a M. et al., 2014. Spectrum of disease and outcome in children with symptomatic congenital cytomegalovirus infection. *The Journal of pediatrics*, 164(4), pp.855–9. Available at: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24433826.

Durafourt, B. a. et al., 2012. Comparison of polarization properties of human adult microglia and blood-derived macrophages. *Glia*, 60(5), pp.717–727.

Ehrengruber, M.U. et al., 2002. Measles virus spreads in rat hippocampal neurons by cell-to-cell contact and in a polarized fashion. *Journal of virology*, 76(11), pp.5720–5728.

Elizabeth C. Swanson, DO and Mark R. Schleiss, M., 2013. Congenital cytomegalovirus infection : new prospects for prevention and therapy . Congenital cytomegalovirus infection : current strategies and future perspectives . Antiviral treatment of cytomegalovirus infection . *pediatr Clin North Al*, 60(2), pp.1–17.

Enders, G. et al., 2011. Intrauterine transmission and clinical outcome of 248 pregnancies with primary cytomegalovirus infection in relation to gestational age. *Journal of Clinical Virology*, 52(3), pp.244–246. Available at: http://dx.doi.org/10.1016/j.jcv.2011.07.005.

Engman, M.-L. et al., 2010. Congenital cytomegalovirus infection: the impact of cerebral cortical malformations. *Acta paediatrica (Oslo, Norway : 1992)*, 99(9), pp.1344–9.

Available at: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20456271 [Accessed January 26, 2012].

Erice, a, 1999. Resistance of human cytomegalovirus to antiviral drugs. *Clinical microbiology reviews*, 12(2), pp.286–297.

Espeche, A.L. & Caraballo, R.H., 2010. Benign infantile seizures associated with gastroenteritis and benign infantile seizures alone in the same patients: Related syndromes or coincidental entities? *Epilepsy Research*, 92(2-3), pp.249–252. Available at: http://dx.doi.org/10.1016/j.eplepsyres.2010.09.012.

Feire, A.L., Koss, H. & Compton, T., 2004. Cellular integrins function as entry receptors for human cytomegalovirus via a highly conserved disintegrin-like domain. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 101(43), pp.15470–5. Available at: http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=524452&tool=pmcentrez&rendertype=abstract.

Ferrini, F. & Koninck, Y. De, 2013. Microglia Control Neuronal Network Excitability via BDNF Signalling. , 2013.

Feuer, R. et al., 2003. Coxsackievirus B3 and the neonatal CNS: the roles of stem cells, developing neurons, and apoptosis in infection, viral dissemination, and disease. *The American journal of pathology*, 163(4), pp.1379–93. Available at: http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=1868316&tool=pmcentrez&rendertype=abstract.

Finlay, B.L., 2008. Extrapolating Brain Development From. , 28(5), pp.931–937.

Fisher, S. et al., 2000. Human cytomegalovirus infection of placental cytotrophoblasts in vitro and in utero: implications for transmission and pathogenesis. *Journal of virology*, 74(15), pp.6808–6820.

Fletcher, N.F. et al., 2012. Hepatitis C virus infects the endothelial cells of the blood-brain barrier. *Gastroenterology*, 142(3), pp.634–643.e6. Available at: http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0016508511016246 [Accessed September 30, 2015].

Ford, A.L. et al., 1996. Microglia induce CD4 T lymphocyte final effector function and death. *The Journal of experimental medicine*, 184(5), pp.1737–1745.

Fouts, a. E. et al., 2012. Antibodies against the gH/gL/UL128/UL130/UL131 Complex Comprise the Majority of the Anti-Cytomegalovirus (Anti-CMV) Neutralizing Antibody Response in CMV Hyperimmune Globulin. *Journal of Virology*, 86(13), pp.7444–7447.

Fowler, K.B. & Boppana, S.B., 2006. Congenital cytomegalovirus (CMV) infection and hearing deficit. *Journal of Clinical Virology*, 35(2), pp.226–231.

Getts, D.R. et al., 2008. Ly6c+ “inflammatory monocytes” are microglial precursors recruited in a pathogenic manner in West Nile virus encephalitis. *The Journal of experimental medicine*, 205(10), pp.2319–37. Available at:

http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=2556789&tool=pmcentrez&rendertype=abstract [Accessed December 16, 2013].

Gilden, D. et al., 2009. Varicella zoster virus vasculopathies: diverse clinical manifestations, laboratory features, pathogenesis, and treatment. *The Lancet Neurology*, 8(8), pp.731–740. Available at: http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1474442209701346.

Ginhoux, F. et al., 2010. Fate mapping analysis reveals that adult microglia derive from primitive macrophages. *Science (New York, N.Y.)*, 330(6005), pp.841–845.

Givens, K.T. et al., 1993. Congenital rubella syndrome: ophthalmic manifestations and associated systemic disorders. *The British journal of ophthalmology*, 77(6), pp.358–363.

Glabinski, A.R. et al., 1996. Chemokine Monocyte Chemoattractant Protein4 Is Expressed by Astrocytes After- Mechanical Injury to the Brain. *Journal of immunology*.

Glass, C.K. et al., 2010. Mechanisms Underlying Inflammation in Neurodegeneration. *Cell*, 140(6), pp.918–934.

Glass, W.G. et al., 2001. Reduced macrophage infiltration and demyelination in mice lacking the chemokine receptor CCR5 following infection with a neurotropic coronavirus. *Virology*, 288(1), pp.8–17. Available at: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11543653.

Goderis, J. et al., 2014. Hearing loss and congenital CMV infection: a systematic review. *Pediatrics*, 134(5), pp.972–82. Available at: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25349318.

Goldmann, T. et al., 2013. A new type of microglia gene targeting shows TAK1 to be pivotal in CNS autoimmune inflammation. *Nature Neuroscience*, 16(11), pp.1618–1626. Available at: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24077561.

González, H. et al., 2014. Neuroimmune regulation of microglial activity involved in neuroinflammation and neurodegenerative diseases. *Journal of Neuroimmunology*, 274(1-2), pp.1–13. Available at: http://dx.doi.org/10.1016/j.jneuroim.2014.07.012.

González, H. & Pacheco, R., 2014. T-cell-mediated regulation of neuroinflammation involved in neurodegenerative diseases. *Journal of Neuroinflammation*, 11(1), p.201. Available at: http://www.jneuroinflammation.com/content/11/1/201.

Graham, J.B., Da Costa, A. & Lund, J.M., 2014. Regulatory T cells shape the resident memory T cell response to virus infection in the tissues. *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)*, 192(2), pp.683–90. Available at: http://www.jimmunol.org/content/192/2/683.full.

Griffith, B.P. et al., 1985. The placenta as a site of cytomegalovirus infection in guinea pigs. *Journal of virology*, 55(2), pp.402–409.

Griffith, B.P., Lucia, H.L. & Hsiung, G.D., 1982. Brain and visceral involvement during congenital cytomegalovirus infection of guinea pigs. *Pediatric research*, 16(6), pp.455–459.

Guillemin, G.J. & Brew, B.J., 2004. Microglia, macrophages, perivascular macrophages, and pericytes: a review of function and identification. *Journal of leukocyte biology*, 75(3),

pp.388–397.

Hagberg, H., Gressens, P. & Mallard, C., 2012. Inflammation during fetal and neonatal life: Implications for neurologic and neuropsychiatric disease in children and adults. *Annals of Neurology*, 71(4), pp.444–457.

Hammond, M.E. et al., 1995. IL-8 induces neutrophil chemotaxis predominantly via type I IL-8 receptors. *Journal of immunology (Baltimore, Md : 1950)*, 155(3), pp.1428–1433. Available at: http://www.jimmunol.org/cgi/reprint/155/3/1428\npapers2://publication/uuid/A24A733F-508A-44DF-A2A8-096D0D96C034.

Hankins, G.D. V & Speer, M., 2003. Defining the pathogenesis and pathophysiology of neonatal encephalopathy and cerebral palsy. *Obstetrics and Gynecology*, 102(3), pp.628–636.

Hansen, S.G. et al., 2003. Complete Sequence and Genomic Analysis of Rhesus Cytomegalovirus Complete Sequence and Genomic Analysis of Rhesus Cytomegalovirus. *Journal of Virology*, 77(12), pp.6620–6636.

Hardwick, J.M., 2001. Apoptosis in viral pathogenesis. *Cell death and differentiation*, 8(2), pp.109–110.

Hardy, J. & Selkoe, D.J., 2002. The amyloid hypothesis of Alzheimer's disease: progress and problems on the road to therapeutics. *Science (New York, N.Y.)*, 297(5580), pp.353–356.

Haspot, F. et al., 2012. Human cytomegalovirus entry into dendritic cells occurs via a macropinocytosis-like pathway in a ph-independent and cholesterol-dependent manner. *PLoS ONE*, 7(4).

Hauwel, M. et al., 2005. Innate (inherent) control of brain infection, brain inflammation and brain repair: the role of microglia, astrocytes, "protective" glial stem cells and stromal ependymal cells. *Brain Research Reviews*, 48(2), pp.220–233. Available at: http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0165017304001894.

Hayes, G.M., Woodroofe, M.N. & Cuzner, M.L., 1987. Microglia are the major cell type expressing MHC class II in human white matter. *Journal of the neurological sciences*, 80(1), pp.25–37.

Hemmings, D.G. et al., 1998. Permissive cytomegalovirus infection of primary villous term and first trimester trophoblasts. *Journal of virology*, 72(6), pp.4970–4979.

Henneke, M. et al., 2009. RNASET2-deficient cystic leukoencephalopathy resembles congenital cytomegalovirus brain infection. *Nature genetics*, 41(7), pp.773–5. Available at: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19525954 [Accessed September 19, 2011].

Hickey, W.F., Hsu, B.L. & Kimura, H., 1991. T-lymphocyte entry into the central nervous system. *Journal of neuroscience research*, 28, pp.254–260.

Higgins, L., Vause, S. & Tower, C., 2010. Cytomegalovirus infection in association with early onset pre-eclampsia. *Case Reports*, 2010(nov09 1), pp.bcr0320102803–bcr0320102803.

Ho, W.S.C. & van den Pol, A.N., 2007. Bystander attenuation of neuronal and astrocyte intercellular communication by murine cytomegalovirus infection of glia. *Journal of virology*, 81(13), pp.7286–92. Available at: http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=1933277&tool=pmcentrez&rendertype=abstract [Accessed April 18, 2012].

Hoffmann, C. et al., 2010. Effect of cytomegalovirus infection on temporal lobe development in utero: quantitative MRI studies. *European neuropsychopharmacology : the journal of the European College of Neuropsychopharmacology*, 20(12), pp.848–54. Available at: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20833515 [Accessed October 13, 2011].

Horvat, J.M.R. and B., 2013. Human herpesvirus 6 and neuroinflammation. *ISNR Virology*, 15(3-4), pp.235–241.

Hu, X. et al., 2014. Microglial and macrophage polarization—new prospects for brain repair. *Nature Reviews Neurology*, 11(1), pp.56–64. Available at: http://www.nature.com/doifinder/10.1038/nrneurol.2014.207.

Isaacson, M.K., Feire, A.L. & Compton, T., 2007. Epidermal growth factor receptor is not required for human cytomegalovirus entry or signaling. *Journal of virology*, 81(12), pp.6241–7. Available at: http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=1900073&tool=pmcentrez&rendertype=abstract [Accessed July 1, 2011].

Ishii, A. et al., 2013. Genetic analysis of PRRT2 for benign infantile epilepsy, infantile convulsions with choreoathetosis syndrome, and benign convulsions with mild gastroenteritis. *Brain and Development*, 35(6), pp.524–530. Available at: http://dx.doi.org/10.1016/j.braindev.2012.09.006.

Ishiwata, M. et al., 2006. Differential expression of the immediate-early 2 and 3 proteins in developing mouse brains infected with murine cytomegalovirus. *Archives of Virology*, 151(11), pp.2181–2196.

J.C., M. et al., 2005. Neurological complications of HIV infection. *Lancet Neurology*, 4(9), pp.543–555. Available at: http://www.scopus.com/inward/record.url?eid=2-s2.0-23744505999&partnerID=40&md5=9c1f3b7326685528c9f94b6b32de6e60\nhttp://ovidsp.ovid.com/ovidweb.cgi?T=JS&PAGE=reference&D=emed7&NEWS=N&AN=2005370414.

Jantzie, L.L., Cheung, P.-Y. & Todd, K.G., 2005. Doxycycline reduces cleaved caspase-3 and microglial activation in an animal model of neonatal hypoxia-ischemia. *Journal of cerebral blood flow and metabolism : official journal of the International Society of Cerebral Blood Flow and Metabolism*, 25(3), pp.314–324.

Jarvis, M. a et al., 2006. Human cytomegalovirus attenuates interleukin-1beta and tumor necrosis factor alpha proinflammatory signaling by inhibition of NF-kappaB activation. *Journal of virology*, 80(11), pp.5588–98. Available at: http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=1472148&tool=pmcentrez&rendertype=abstract [Accessed January 6, 2014].

Ji, A. et al., 2012. N-3 polyunsaturated fatty acids inhibit lipopolysaccharide-induced microglial activation and dopaminergic injury in rats. *NeuroToxicology*, 33(4), pp.780–788.

Johnson, Julie, Brenna Anderson, R.F.P., 2012. Prevention of maternal and congenital cytomegalovirus infection. *Clinical Obstetric and Gynocology*, 55(2), pp.521–530.

Jones, C.A. & Isaacs, D., 1995. Predicting the Outcome of Symptomatic Congenital Cytomegalovirus-Infection. *J Paediatr Child Health*, 31(2), pp.70–71. Available at: <Go to ISI>://WOS:A1995QT90500002.

Juanjuan, C. et al., 2011. Murine model for congenital CMV infection and hearing impairment. *Virology journal*, 8(1), p.70. Available at: http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=3045346&tool=pmcentrez&rendertype=abstract [Accessed October 12, 2011].

Kawasaki, H. et al., 2015. Cytomegalovirus Initiates Infection Selectively from High-Level β1 Integrin-Expressing Cells in the Brain. *The American Journal of Pathology*, 185(5), pp.1–21. Available at: http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0002944015001315.

Kern, F. et al., 2002. Cytomegalovirus (CMV) phosphoprotein 65 makes a large contribution to shaping the T cell repertoire in CMV-exposed individuals. *The Journal of infectious diseases*, 185(12), pp.1709–1716.

Kettenmann, H., Kirchhoff, F. & Verkhratsky, A., 2013. Microglia: New Roles for the Synaptic Stripper. *Neuron*, 77(1), pp.10–18. Available at: http://dx.doi.org/10.1016/j.neuron.2012.12.023.

Khandaker, G.M. et al., 2012. Prenatal maternal infection, neurodevelopment and adult schizophrenia: a systematic review of population-based studies. *Psychological Medicine*, 43(2), pp.1–19.

Kierdorf, K. et al., 2013. Microglia emerge from erythromyeloid precursors via Pu.1- and Irf8-dependent pathways. *Nature neuroscience*, 16(3), pp.273–80. Available at: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23334579 [Accessed December 16, 2013].

Kierdorf, K. & Prinz, M., 2013. Factors regulating microglia activation. *Frontiers in Cellular Neuroscience*, 7(April), pp.1–8. Available at: http://journal.frontiersin.org/article/10.3389/fncel.2013.00044/abstract.

Kizil, C., Kyritsis, N. & Brand, M., 2015. Effects of inflammation on stem cells: together they strive? *EMBO reports*, 16(4), pp.416–26. Available at: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25739812.

Knuesel, I. et al., 2014. Maternal immune activation and abnormal brain development across CNS disorders. *Nature Reviews Neurology*, 10(11), pp.643–660. Available at: http://www.nature.com/doifinder/10.1038/nrneurol.2014.187.

Kondo, K. et al., 1991. Latent human herpesvirus 6 infection of human monocytes/macrophages. *The Journal of general virology*, 72 (Pt 6)(1991), pp.1401–8. Available at: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1646280.

Kong, H. et al., 2003. Human herpesvirus type 6 indirectly enhances oligodendrocyte cell death. *Journal of neurovirology*, 9(5), pp.539–550.

Koontz, T. et al., 2008. Altered development of the brain after focal herpesvirus infection of the central nervous system. *The Journal of experimental medicine*, 205(2), pp.423–35. Available at: http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=2271002&tool=pmcentrez&rendertype=abstract [Accessed October 12, 2011].

Kosmac, K. et al., 2013. Glucocorticoid treatment of MCMV infected newborn mice attenuates CNS inflammation and limits deficits in cerebellar development. *PLoS pathogens*, 9(3), p.e1003200. Available at: http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=3591306&tool=pmcentrez&rendertype=abstract [Accessed January 6, 2014].

Kosugi, I. et al., 2002. Innate immune responses to cytomegalovirus infection in the developing mouse brain and their evasion by virus-infected neurons. *The American journal of pathology*, 161(3), pp.919–928.

Koszinowski, U.H., 1998. Hierarchical and Redundant Lymphocyte Subset Control Precludes Cytomegalovirus Replication during Latent Infection. , 188(6).

Koyuncu, O.O., Hogue, I.B. & Enquist, L.W., 2013. Virus infections in the nervous system. *Cell Host and Microbe*, 13(4), pp.379–393. Available at: http://dx.doi.org/10.1016/j.chom.2013.03.010.

Krmpotić, A. et al., 2002. MCMV glycoprotein gp40 confers virus resistance to CD8+ T cells and NK cells in vivo. *Nature Immunology*, 3(6), pp.529–535. Available at: http://www.nature.com/doifinder/10.1038/ni799.

Labouesse, M.A., Langhans, W. & Meyer, U., 2015. Long-term pathological consequences of prenatal infection: Beyond brain disorders. *American Journal of Physiology - Regulatory, Integrative and Comparative Physiology*, p.ajpregu.00087.2015. Available at: http://ajpregu.physiology.org/lookup/doi/10.1152/ajpregu.00087.2015.

Lambertsen, K.L. et al., 2011. Differences in origin of reactive microglia in bone marrow chimeric mouse and rat after transient global ischemia. *Journal of neuropathology and experimental neurology*, 70(6), pp.481–494.

Lampron, A., ElAli, A. & Rivest, S., 2013. Innate Immunity in the CNS: Redefining the relationship between the CNS and its Environment. *Neuron*, 78(2), pp.214–232.

Lawrence, D.M. et al., 2000. Measles virus spread between neurons requires cell contact but not CD46 expression, syncytium formation, or extracellular virus production. *Journal of virology*, 74(4), pp.1908–18. Available at: http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=111669&tool=pmcentrez&rendertype=abstract.

Lecointe, D. et al., 1999. Differences in kinetics of human cytomegalovirus cell-free viral release after in vitro infection of human microglial cells, astrocytes and monocyte-derived

macrophages. *Journal of Neurovirology*, 5(3), pp.308–313. Available at: http://informahealthcare.com/doi/abs/10.3109/13550289909015817.

Lecointe, D. et al., 2002. Human cytomegalovirus infection reduces surface CCR5 expression in human microglial cells, astrocytes and monocyte-derived macrophages. *Microbes and infection / Institut Pasteur*, 4(14), pp.1401–8. Available at: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12475630.

Lee, S.H. et al., 2001. Susceptibility to mouse cytomegalovirus is associated with deletion of an activating natural killer cell receptor of the C-type lectin superfamily. *Nature genetics*, 28(1), pp.42–5. Available at: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11326273.

Lewis, M. & Howdle, P.D., 2003. The neurology of liver failure. *QJM - Monthly Journal of the Association of Physicians*, 96(9), pp.623–633.

Lhatoo, S., Noebels, J. & Whittemore, V., 2015. Sudden unexpected death in epilepsy: Identifying risk and preventing mortality. *Epilepsia*, p.n/a–n/a. Available at: http://doi.wiley.com/10.1111/epi.13134.

Li, R.Y. & Tsutsui, Y., 2000. Growth retardation and microcephaly induced in mice by placental infection with murine cytomegalovirus. *Teratology*, 62(2), pp.79–85. Available at: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10931504.

Li, Y. et al., 2012. Reciprocal Regulation between Resting Microglial Dynamics and Neuronal Activity In Vivo. *Developmental Cell*, 23(6), pp.1189–1202. Available at: http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S153458071200490X.

Liang, X.H. et al., 1999. Resistance of interleukin-1 beta-deficient mice to fatal Sindbis virus encephalitis. *Journal of Virology*, IROLOGY(3), pp.2563–2567.

Libbey, J.E. et al., 2011. Once initiated, viral encephalitis-induced seizures are consistent no matter the treatment or lack of interleukin-6. *Journal of NeuroVirology*, 17(5), pp.496–499. Available at: http://link.springer.com/10.1007/s13365-011-0050-5.

Lilja, A.E. et al., 2008. Functional genetic analysis of rhesus cytomegalovirus: Rh01 is an epithelial cell tropism factor. *Journal of virology*, 82(5), pp.2170–2181.

Lin, K.H. et al., 2005. Case Report Post-poliomyelitis Syndrome : Case Report and Review of the Literature. , 34(7), pp.447–449.

Loh, H.S. et al., 2003. Characterization of a novel rat cytomegalovirus (RCMV) infecting placenta-uterus of Rattus rattus diardii. *Archives of Virology*, 148(12), pp.2353–2367.

Loh, H.-S. et al., 2006. Pathogenesis and vertical transmission of a transplacental rat cytomegalovirus. *Virology journal*, 3, p.42. Available at: http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=1500997&tool=pmcentrez&rendertype=abstract [Accessed August 1, 2012].

Lokensgard, J.R. et al., 2002. Glial cell responses to herpesvirus infections: role in defense and immunopathogenesis. *The Journal of infectious diseases*, 186 Suppl , pp.S171–9. Available at: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12424694.

López, S. & Arias, C.F., 2004. Multistep entry of rotavirus into cells: a Versaillesque dance. *Trends in microbiology*, 12(6), pp.271–8. Available at: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15165605 [Accessed September 27, 2011].

Lucas, S.-M., Rothwell, N.J. & Gibson, R.M., 2006. The role of inflammation in CNS injury and disease. *British journal of pharmacology*, 147 Suppl , pp.S232–S240.

Lynch, M. et al., 2001. Rotavirus and central nervous system symptoms: cause or contaminant? Case reports and review. *Clinical infectious diseases : an official publication of the Infectious Diseases Society of America*, 33(7), pp.932–938.

Malinger, G. et al., 2003. Fetal cytomegalovirus infection of the brain: The spectrum of sonographic findings. *American Journal of Neuroradiology*, 24(1), pp.28–32.

Manara, R. et al., 2011. Brain magnetic resonance findings in symptomatic congenital cytomegalovirus infection. *Pediatric Radiology*, 41(8), pp.962–970.

Manicklal, S. et al., 2013. The "silent" global burden of congenital cytomegalovirus. *Clinical microbiology reviews*, 26(1), pp.86–102. Available at: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23297260 [Accessed December 17, 2013].

Mantovani, A. et al., 2011. Neutrophils in the activation and regulation of innate and adaptive immunity. *Nature Reviews Immunology*, 11(8), pp.519–531. Available at: http://www.nature.com/doifinder/10.1038/nri3024.

Mariani, M.M. & Kielian, T., 2009. Microglia in Infectious Diseases of the Central Nervous System. *Journal of Neuroimmune Pharmacology*, 4(4), pp.448–461. Available at: http://link.springer.com/10.1007/s11481-009-9170-6.

Marques, F. & Sousa, J.C., 2015. The choroid plexus is modulated by various peripheral stimuli: implications to diseases of the central nervous system. *Frontiers in Cellular Neuroscience*, 9(April), pp.1–6. Available at: http://journal.frontiersin.org/article/10.3389/fncel.2015.00136/abstract.

Marshall, B.C. & Koch, W.C., 2009. Antivirals for Cytomegalovirus Infection in Neonates and Infants. *Pediatric Drugs*, 11(5), pp.309–321.

Martinat, C. et al., 1999. The GDVII strain of Theiler's virus spreads via axonal transport. *J Virol*, 73(7), pp.6093–6098. Available at: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=10364364\npapers://497fa013-e17c-4362-b4c6-8f807eac5791/Paper/p1372.

Martinez, F.O. & Gordon, S., 2014. The M1 and M2 paradigm of macrophage activation: time for reassessment. *F1000Prime Reports*, 6(March), pp.1–13. Available at: http://www.f1000.com/prime/reports/b/6/13.

McGavern, D.B. & Kang, S.S., 2011. Illuminating viral infections in the nervous system. *Nature reviews. Immunology*, 11(5), pp.318–329. Available at: http://dx.doi.org/10.1038/nri2971.

McGrath, N. et al., 1997. Herpes simplex encephalitis treated with acyclovir: diagnosis and long term outcome. *Journal of neurology, neurosurgery, and psychiatry*, 63(3), pp.321–326.

Meyer, U., 2014. Prenatal Poly(I:C) exposure and other developmental immune activation models in rodent systems. *Biological Psychiatry*, 75(4), pp.307–315.

Meyer, U., Feldon, J. & Fatemi, S.H., 2009. In-vivo rodent models for the experimental investigation of prenatal immune activation effects in neurodevelopmental brain disorders. *Neuroscience and Biobehavioral Reviews*, 33(7), pp.1061–1079.

Meyer, U., Yee, B.K. & Feldon, J., 2007. The neurodevelopmental impact of prenatal infections at different times of pregnancy: the earlier the worse? *The Neuroscientist : a review journal bringing neurobiology, neurology and psychiatry*, 13(3), pp.241–256.

Michell-Robinson, M. a. et al., 2015. Roles of microglia in brain development, tissue maintenance and repair. *Brain*, 138(5), pp.1138–1159. Available at: http://www.brain.oxfordjournals.org/lookup/doi/10.1093/brain/awv066.

Miller, D.M. et al., 2001. Cytomegalovirus and transcriptional down-regulation of major histocompatibility complex class II expression. *Seminars in immunology*, 13(1), pp.11–18.

Miller, J.E. et al., 2013. Maternal infections during pregnancy and cerebral palsy: A population-based cohort study. *Paediatric and Perinatal Epidemiology*, 27(6), pp.542–552.

De Miranda, J. et al., 2010. Induction of Toll-Like Receptor 3-Mediated Immunity during Gestation Inhibits Cortical Neurogenesis and Causes Behavioral Disturbances. *mBio*, 1(4), pp.1–10. Available at: http://mbio.asm.org/content/1/4/e00176-10.short.

Mishra, M.K. & Basu, A., 2008. Minocycline neuroprotects, reduces microglial activation, inhibits caspase 3 induction, and viral replication following Japanese encephalitis. *Journal of Neurochemistry*, 105(5), pp.1582–1595.

Mitrovic, M. et al., 2012. The NK Cell Response to Mouse Cytomegalovirus Infection Affects the Level and Kinetics of the Early CD8+ T-Cell Response. *Journal of Virology*, 86(4), pp.2165–2175.

Mori, I. et al., 2005. Olfactory transmission of neurotropic viruses. *Journal of neurovirology*, 11(2), pp.129–137.

Moti L. Chapagaina, Saguna Vermaa, Frederic Merciera, Richard Yanagiharaa,b, and V.R.N., 2008. Polyomavirus JC Infects Human Brain Microvascular Endothelial Cells Independent of Serotonin Receptor 2A. *Virology*, 364(1), pp.55–63. Available at: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2034208/pdf/nihms25512.pdf.

Müller, a et al., 2008. Oral valganciclovir for symptomatic congenital cytomegalovirus infection in an extremely low birth weight infant. *Journal of perinatology : official journal of the California Perinatal Association*, 28(1), pp.74–76.

Mutnal, M.B. et al., 2010. Excess neutrophil infiltration during cytomegalovirus brain infection of interleukin-10-deficient mice. *Journal of neuroimmunology*, 227(1-2), pp.101–10. Available at: http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=2942961&tool=pmcentrez&rendertype=abstract [Accessed April 9, 2014].

Mutnal, M.B. et al., 2014. Infiltrating Regulatory B Cells Control Neuroinflammation following Viral Brain Infection. *The Journal of Immunology*, 193, pp.6070–6080. Available at: http://www.jimmunol.org/cgi/doi/10.4049/jimmunol.1400654.

Mutnal, M.B., Hu, S., et al., 2011. Memory T cells persisting in the brain following MCMV infection induce long-term microglial activation via interferon-γ. *Journal of neurovirology*, 17(5), pp.424–37. Available at: http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=3204167&tool=pmcentrez&rendertype=abstract [Accessed April 9, 2014].

Mutnal, M.B., Cheeran, M.C.-J., et al., 2011b. Murine cytomegalovirus infection of neural stem cells alters neurogenesis in the developing brain. *PloS one*, 6(1), p.e16211. Available at: http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=3020957&tool=pmcentrez&rendertype=abstract [Accessed January 30, 2014].

Mutnal, M.B., Cheeran, M.C.-J., et al., 2011a. Murine cytomegalovirus infection of neural stem cells alters neurogenesis in the developing brain. *PloS one*, 6(1), p.e16211. Available at: http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=3020957&tool=pmcentrez&rendertype=abstract [Accessed October 12, 2011].

Mutnal, M.B., Hu, S. & Lokensgard, J.R., 2012. Persistent humoral immune responses in the CNS limit recovery of reactivated murine cytomegalovirus. *PloS one*, 7(3), p.e33143. Available at: http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=3295797&tool=pmcentrez&rendertype=abstract\nhttp://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22412996.

Nargi-aizenman, J.L. & Griffin, D.E., 2001. Sindbis Virus-Induced Neuronal Death Is both Necrotic and Apoptotic and Is Ameliorated by N -Methyl-d-Aspartate Receptor Antagonists Sindbis Virus-Induced Neuronal Death Is both Necrotic and Apoptotic and Is Ameliorated by N -Methyl- D -Aspartate Receptor. , 75(15), pp.7114–7121.

Naruse, I. & Tsutsui, Y., 1989. Brain abnormalities induced by murine cytomegalovirus injected into the cerebral ventricles of mouse embryos exo utero. *Teratology*, 40(2), pp.181–189.

Nash, B. et al., 2011. Functional duality of astrocytes in myelination. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience*, 31(37), pp.13028–13038.

Nassetta, L., Kimberlin, D. & Whitley, R., 2009. Treatment of congenital cytomegalovirus infection: Implications for future therapeutic strategies. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 63(5), pp.862–867.

Nathan, C., 2006. Neutrophils and immunity: challenges and opportunities. *Nature Reviews Immunology*, 6(3), pp.173–182. Available at: http://www.nature.com/doifinder/10.1038/nri1785.

Navarro, D. et al., 1997. Humoral immune response to functional regions of human cytomegalovirus glycoprotein B. *Journal of medical virology*, 52(4), pp.451–459.

Nigro, G. et al., 2005. Passive immunization during pregnancy for congenital cytomegalovirus infection. *The New England journal of medicine*, 353(13), pp.1350–1362.

Nigro, G. et al., 2015. Primary maternal cytomegalovirus infections during pregnancy: association of CMV hyperimmune globulin with gestational age at birth and birth weight. *The Journal of Maternal-Fetal & Neonatal Medicine*, 28(2), pp.168–171. Available at: http://www.tandfonline.com/doi/full/10.3109/14767058.2014.907265.

Nigro, G. et al., 2008. Regression of fetal cerebral abnormalities by primary cytomegalovirus infection following hyperimmunoglobulin therapy. *Prenatal Diagnosis*, 28(6), pp.512–517. Available at: http://doi.wiley.com/10.1002/pd.2013.

Nimmerjahn, A., Kirchhoff, F. & Helmchen, F., 2005. Resting Microglial Cells Are Highly Dynamic Surveillants of Brain Parenchyma in Vivo — Resting Microglial Cells Are Highly Dynamic Surveillants of Brain Parenchyma in Vivo — Supporting Online Material. , 308(May), pp.1314–1319. Available at: http://www.sciencemag.org/content/suppl/2005/05/26/1110647.DC1.

Noda, S. et al., 2006. Cytomegalovirus MCK-2 controls mobilization and recruitment of myeloid progenitor cells to facilitate dissemination. *Blood*, 107(1), pp.30–8. Available at: http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=1895360&tool=pmcentrez&rendertype=abstract [Accessed January 6, 2014].

Norden, D.M., Muccigrosso, M.M. & Godbout, J.P., 2014. Microglial priming and enhanced reactivity to secondary insult in aging, and traumatic CNS injury, and neurodegenerative disease. *Neuropharmacology*, 96, pp.29–41. Available at: http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0028390814004031.

Nyholm, J.L. & Schleiss, M.R., 2010. Prevention of maternal cytomegalovirus infection: current status and future prospects. , 2, pp.23–35.

Odeberg, J. et al., 2006. Human cytomegalovirus inhibits neuronal differentiation and induces apoptosis in human neural precursor cells. *Journal of virology*, 80(18), pp.8929–8939.

Olivier Picone1*, Isabelle Simon2, Alexandra Benachi1, F.B. and P.S., 2008. Comparison between ultrasound and magnetic resonance imaging in assessment of fetal cytomegalovirus infection. *Prenatal diagnosis*, 28(10), pp.753–758.

Van Opdenbosch, N., Favoreel, H. & Van de Walle, G.R., 2012. Histone modifications in herpesvirus infections. *Biology of the cell / under the auspices of the European Cell Biology Organization*, 104(3), pp.139–64. Available at: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22188068.

Ousman, S.S. & Kubes, P., 2012. Immune surveillance in the central nervous system. *Nature neuroscience*, 15(8), pp.1096–101. Available at: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22837040 [Accessed May 25, 2014].

Owens, G.P. et al., 2011. Virues and Multiple Sclerosis. *Neuroscientist*, 17(6), pp.659–676.

Owens, G.P. et al., 2011. Viruses and multiple sclerosis. *The Neuroscientist : a review journal bringing neurobiology, neurology and psychiatry*, 17(6), pp.659–76. Available at: http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=3293404&tool=pmcentrez&rendertype=abstract.

Paintlia, M.K. et al., 2008. Lipopolysaccharide-induced peroxisomal dysfunction exacerbates cerebral white matter injury: Attenuation by N-acetyl cysteine. *Experimental Neurology*, 210(2), pp.560–576. Available at: http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0014488607004499.

Paolicelli, R.C. et al., 2011. Synaptic Pruning by Microglia Is Necessary for Normal Brain Development. *Science*, 333(6048), pp.1456–1458. Available at: http://www.sciencemag.org/cgi/doi/10.1126/science.1202529.

Patterson, P.H., 2011. Maternal infection and immune involvement in autism. *Trends in Molecular Medicine*, 17(7), pp.389–394. Available at: http://dx.doi.org/10.1016/j.molmed.2011.03.001.

Pearce, B.D., 2001. Schizophrenia and viral infection during neurodevelopment: a focus on mechanisms. *Molecular psychiatry*, 6(6), pp.634–646.

Pender, M.P. & Burrows, S.R., 2014. Epstein-Barr virus and multiple sclerosis: potential opportunities for immunotherapy. *Clinical & translational immunology*, 3(10), p.e27. Available at: http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=4237030&tool=pmcentrez&rendertype=abstract.

Perry, V.H. & Holmes, C., 2014. Microglial priming in neurodegenerative disease. *Nature reviews. Neurology*, 10(4), pp.217–24. Available at: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24638131.

Perry, V.H. & Teeling, J., 2013. Microglia and macrophages of the central nervous system: The contribution of microglia priming and systemic inflammation to chronic neurodegeneration. *Seminars in Immunopathology*, 35(5), pp.601–612.

Persico, A.M. & Bourgeron, T., 2006. Searching for ways out of the autism maze: genetic, epigenetic and environmental clues. *Trends in Neurosciences*, 29(7), pp.349–358.

Pfeiffer, J.K., 2011. Innate host barriers to viral trafficking and population diversity : Lessons learned from poliovirus. *Adv Virus Res*, pp.1–29.

Plotkin, S.A. et al., 1984. Towne-vaccine-induced prevention of cytomegalovirus disease after renal transplants. *Lancet*, 1, pp.528–530.

van Den Pol, a N. et al., 1999. Cytomegalovirus cell tropism, replication, and gene transfer in brain. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience*, 19(24), pp.10948–65. Available at: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10594076.

Pol, A. Van Den & Reuter, J., 2002. Enhanced cytomegalovirus infection of developing brain independent of the adaptive immune system. *Journal of virology*, 76(17), pp.8842–8854. Available at: http://jvi.asm.org/content/76/17/8842.short [Accessed July 5, 2012].

van den Pol, A.N. et al., 2007. Cytomegalovirus induces interferon-stimulated gene expression and is attenuated by interferon in the developing brain. *Journal of virology*, 81(1), pp.332–48. Available at:

http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=1797251&tool=pmcentrez&rendertype=abstract [Accessed January 4, 2012].

Pol, A.N. Van Den, 2006. Viral infections in the developing and mature brain. *Trends in Neurosciences*, 29(7).

van den Pol, A.N., 2006. Viral infections in the developing and mature brain. *Trends in neurosciences*, 29(7), pp.398–406. Available at: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16806513 [Accessed July 5, 2011].

van den Pol, A.N., Ding, S. & Robek, M.D., 2014. Long-distance interferon signaling within the brain blocks virus spread. *Journal of virology*, 88(7), pp.3695–704. Available at: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24429359.

Pollock, J.L. & Virgin, H.W., 1995. Latency, without persistence, of murine cytomegalovirus in the spleen and kidney. *Journal of virology*, 69(3), pp.1762–1768.

Ponomarev, E.D. et al., 2011. MicroRNA-124 promotes microglia quiescence and suppresses EAE by deactivating macrophages via the C/EBP-α-PU.1 pathway. *Nature medicine*, 17, pp.64–70.

Popovich, P.G. & Longbrake, E.E., 2008. Can the immune system be harnessed to repair the CNS? *Nature reviews. Neuroscience*, 9(6), pp.481–493.

Powell, C.M. & Miyakawa, T., 2006. Schizophrenia-Relevant Behavioral Testing in Rodent Models: A Uniquely Human Disorder? *Biological Psychiatry*, 59, pp.1198–1207.

Powell, E.M., 2013. Interneuron development and epilepsy: Early genetic defects cause long-term consequences in seizures and susceptibility. *Epilepsy Currents*, 13(4), pp.172–176.

Prateek, B., Narang, a. & Minz, R.W., 2010. Neonatal cytomegalovirus infection: Diagnostic modalities available for early disease detection. *Indian Journal of Pediatrics*, 77(1), pp.77–79.

Prinz, M. & Priller, J., 2014. Microglia and brain macrophages in the molecular age: from origin to neuropsychiatric disease. *Nature reviews. Neuroscience*, 15(5), pp.300–12. Available at: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24713688 [Accessed May 23, 2014].

Priscott, P.K. & Tyrrell, D. a J., 1982. The isolation and partial characterisation of a cytomegalovirus from the brown rat, Rattus norvegicus. *Archives of Virology*, 73(2), pp.145–160.

Protul et al., 1970. The Central Nervous System as an immunocompetent organ in antigen presentation. *Journal of immunology*, 63(5), p.543.

Rasmussen, L. et al., 1991. Antibody response to human cytomegalovirus glycoproteins gB and gH after natural infection in humans. *The Journal of infectious diseases*, 164(5), pp.835–842. Available at: http://jid.oxfordjournals.org/lookup/pmid?view=long&pmid=1658156\npapers2://publication/uuid/C415BE96-57BF-4F74-915A-F3258CD3F4A3.

Reddehase, M.J. & Grzimek, N.K. a, 2002. Mouse models of cytomegalo v irus latency : o v er v iew. , 25, pp.23–36.

Rhoades, R.E. et al., 2011. Enterovirus infections of the central nervous system. *Virology*, 411(2), pp.288–305. Available at: http://dx.doi.org/10.1016/j.virol.2010.12.014.

Richa Hanamsagar1, Mark L. Hanke2, and Tammy Kielian2, 1Department, 2012. Toll-like receptor TLR and Inflammasome Actions in the Central Nervous System : New and Emerging Concepts. *Changes*, 29(6), pp.997–1003.

Rieder, F. & Steininger, C., 2013. Cytomegalovirus vaccine: phase II clinical trial results. *Clinical microbiology and infection : the official publication of the European Society of Clinical Microbiology and Infectious Diseases*. Available at: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24283990.

Roca, H. et al., 2009. CCL2 and interleukin-6 promote survival of human CD11b+ peripheral blood mononuclear cells and induce M2-type macrophage polarization. *Journal of Biological Chemistry*, 284(49), pp.34342–34354.

Roe, K. et al., 2012. West Nile virus-induced disruption of the blood-brain barrier in mice is characterized by the degradation of the junctional complex proteins and increase in multiple matrix metalloproteinases. *Journal of General Virology*, 93(Pt_6), pp.1193–1203. Available at: http://jgv.microbiologyresearch.org/content/journal/jgv/10.1099/vir.0.040899-0.

Ronan, J.L., Wu, W. & Crabtree, G.R., 2013. From neural development to cognition: unexpected roles for chromatin. *Nature reviews. Genetics*, 14(5), pp.347–59. Available at: http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=4010428&tool=pmcentrez&rendertype=abstract.

Roumier, A. et al., 2008. Prenatal Activation of Microglia Induces Delayed Impairment of Glutamatergic Synaptic Function. *PLoS ONE*, 3(7), p.e2595. Available at: http://dx.plos.org/10.1371/journal.pone.0002595.

Ryckman, B.J. et al., 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), pp.710–722.

Saederup, N. et al., 2001. Murine cytomegalovirus CC chemokine homolog MCK-2 (m131-129) is a determinant of dissemination that increases inflammation at initial sites of infection. *Journal of virology*, 75(20), pp.9966–9976. Available at: http://jvi.asm.org/content/75/20/9966.short [Accessed October 15, 2014].

Sakamoto, A. et al., 2014. Retrospective diagnosis of congenital cytomegalovirus infection in children with autism spectrum disorder but no other major neurologic deficit. *Brain & development*, 37(2), pp.1–6. Available at: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24768169.

Sakao-Suzuki, M. et al., 2014. Aberrant fetal macrophage/microglial reactions to cytomegalovirus infection. *Annals of clinical and translational neurology*, 1(8), pp.570–88. Available at: http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=4184560&tool=pmcentrez&ren

dertype=abstract [Accessed November 17, 2014].

Sakka, L., Coll, G. & Chazal, J., 2011. Anatomy and physiology of cerebrospinal fluid. *European Annals of Otorhinolaryngology, Head and Neck Diseases*, 128(6), pp.309–316. Available at: http://dx.doi.org/10.1016/j.anorl.2011.03.002.

Scheck, S.M., Boyd, R.N. & Rose, S.E., 2012. New insights into the pathology of white matter tracts in cerebral palsy from diffusion magnetic resonance imaging: A systematic review. *Developmental Medicine and Child Neurology*, 54(8), pp.684–696.

Schleiss, M., 2006. Nonprimate models of congenital cytomegalovirus (CMV) infection: gaining insight into pathogenesis and prevention of disease in newborns. *ILAR JOURNAL*, 47(1), pp.65–72. Available at: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16391432 [Accessed April 18, 2012].

Schleiss, M.R., 2009. Persistent and Recurring Viral Infections: The Human Herpesviruses. *Current Problems in Pediatric and Adolescent Health Care*, 39(1), pp.7–23.

Schut, R.L. et al., 1994. Cytomegalovirus replication in murine microglial cell cultures: suppression of permissive infection by interferon-gamma. *The Journal of infectious diseases*, 169(5), pp.1092–6. Available at: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8169398.

Schwerk, C. et al., 2015. The choroid plexus-a multi-role player during infectious diseases of the CNS. *Frontiers in cellular neuroscience*, 9(March), p.80. Available at: http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=4357259&tool=pmcentrez&rendertype=abstract.

Sellner, J. et al., 2009. A case of maternal herpes simplex virus encephalitis during late pregnancy. *Nature clinical practice. Neurology*, 5(1), pp.51–6. Available at: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19129790.

Shechter, R. et al., 2013. Recruitment of beneficial M2 macrophages to injured spinal cord is orchestrated by remote brain choroid plexus. *Immunity*, 38(3), pp.555–69. Available at: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23477737 [Accessed January 3, 2014].

Shi, C. & Pamer, E.G., 2011. Monocyte recruitment during infection and inflammation. *Nature reviews. Immunology*, 11(11), pp.762–74. Available at: http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=3947780&tool=pmcentrez&rendertype=abstract [Accessed March 19, 2014].

Shinmura, Y. & Kosugi, I., 1997. Disordered migration and loss of virus-infected neuronal cells in developing mouse brains infected with murine cytomegalovirus. *English Journal*, pp.551–557.

Sieger, D. et al., 2012. Long-Range Ca2+ Waves Transmit Brain-Damage Signals to Microglia. *Developmental Cell*, 22(6), pp.1138–1148. Available at: http://dx.doi.org/10.1016/j.devcel.2012.04.012.

Sierra, A. et al., 2010. Microglia shape adult hippocampal neurogenesis through apoptosis-coupled phagocytosis. *Cell Stem Cell*, 7(4), pp.483–495. Available at:

http://dx.doi.org/10.1016/j.stem.2010.08.014.

Simonazzi, G. et al., 2010. Fetal cerebral periventricular halo at midgestation: an ultrasound finding suggestive of fetal cytomegalovirus infection. *American journal of obstetrics and gynecology*, 202(6), pp.599.e1–5. Available at: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20227051 [Accessed January 6, 2014].

Slavuljica, I. et al., 2014. Immunobiology of congenital cytomegalovirus infection of the central nervous system—the murine cytomegalovirus model. *Cellular and Molecular Immunology*, 12(2), pp.180–191. Available at: http://www.nature.com/doifinder/10.1038/cmi.2014.51.

Smith, G., 2012. Herpesvirus Transport to the Nervous System and Back Again. *Annual Review of Microbiology*, 66(1), pp.153–176.

Solomon, T. et al., 2010. Virology, epidemiology, pathogenesis, and control of enterovirus 71. *The Lancet Infectious Diseases*, 10(11), pp.778–790.

Soroceanu, L., Akhavan, A. & Cobbs, C.S., 2008. Platelet-derived growth factor-alpha receptor activation is required for human cytomegalovirus infection. *Nature*, 455(7211), pp.391–5. Available at: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18701889 [Accessed September 12, 2011].

Soulas, C. et al., 2009. Genetically modified CD34+ hematopoietic stem cells contribute to turnover of brain perivascular macrophages in long-term repopulated primates. *The American journal of pathology*, 174(5), pp.1808–1817. Available at: http://dx.doi.org/10.2353/ajpath.2009.081010.

Squarzoni, P. et al., 2014. Microglia Modulate Wiring of the Embryonic Forebrain. *Cell Reports*, 8(5), pp.1271–1279. Available at: http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S2211124714006263.

Steinbach, K. et al., 2013. Neutrophils Amplify Autoimmune Central Nervous System Infiltrates by Maturing Local APCs. *The Journal of Immunology*, 191(9), pp.4531–4539. Available at: http://www.jimmunol.org/cgi/doi/10.4049/jimmunol.1202613.

Stephen E. P. Smith1, Jennifer Li1, Krassimira Garbett2, Karoly Mirnics2, and P.H.P., 2008. Maternal Immune Activation Alters Fetal Brain Development through Interleukin-6. , 15(10), pp.1203–1214.

Stern, H., 1976. Infantile spasms and cytomegalovirus infection. *Lancet*, 2(7983), p.473.

Stern, J.L. & Slobedman, B., 2008. Human cytomegalovirus latent infection of myeloid cells directs monocyte migration by up-regulating monocyte chemotactic protein-1. *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)*, 180(10), pp.6577–85. Available at: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18453576.

Strauss-Ayali, D., Conrad, S.M. & Mosser, D.M., 2007. Monocyte subpopulations and their differentiation patterns during infection. *Journal of leukocyte biology*, 82(2), pp.244–52. Available at: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17475785 [Accessed March 19, 2014].

Streblow, D.N. et al., 2005. Rat cytomegalovirus-accelerated transplant vascular sclerosis is

reduced with mutation of the chemokine-receptor R33. *American Journal of Transplantation*, 5(3), pp.436–442.

Su, P. et al., 2014. The interaction between microglia and neural stem/precursor cells. *Brain research bulletin*, 109, pp.32–8. Available at: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25245208.

Sun, S. et al., 2014. Inhibition of the Activation and Recruitment of Microglia-Like Cells Protects Against Neomycin-Induced Ototoxicity. , pp.252–267.

Suzuki, Y. et al., 2008. Epilepsy in patients with congenital cytomegalovirus infection. *Brain & development*, 30(6), pp.420–4. Available at: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18215482 [Accessed January 9, 2012].

Tabor-godwin, J.M. et al., 2010. A Novel Population of Myeloid Cells Responding to Coxsackievirus Infection Assists in the Dissemination of Virus within the Neonatal CNS. , 30(25), pp.8676–8691.

Takeuchi, O. & Akira, S., 2010. Pattern Recognition Receptors and Inflammation. *Cell*, 140(6), pp.805–820.

Tarantal, a F. et al., 1998. Neuropathogenesis induced by rhesus cytomegalovirus in fetal rhesus monkeys (Macaca mulatta). *The Journal of infectious diseases*, 177(2), pp.446–450.

Teissier, N. et al., 2014. Cytomegalovirus-induced brain malformations in fetuses. *Journal of neuropathology and experimental neurology*, 73(2), pp.143–58. Available at: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24423639.

Teodoro, J.G. & Branton, P.E., 1997. Regulation of apoptosis by viral gene products. *Journal of virology*, 71(3), pp.1739–1746.

Terry, R.L. et al., 2012. Inflammatory monocytes and the pathogenesis of viral encephalitis. *Journal of neuroinflammation*, 9(1), p.270. Available at: http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=3560265&tool=pmcentrez&rendertype=abstract.

Tomtishen III, J., 2012. Human cytomegalovirus tegument proteins (pp65, pp71, pp150, pp28). *Virology Journal*, 9(1), p.22. Available at: http://www.virologyj.com/content/9/1/22.

La Torre, R. et al., 2006. Placental enlargement in women with primary maternal cytomegalovirus infection is associated with fetal and neonatal disease. *Clinical infectious diseases : an official publication of the Infectious Diseases Society of America*, 43(8), pp.994–1000.

Tremblay, M.E., Lowery, R.L. & Majewska, A.K., 2010. Microglial interactions with synapses are modulated by visual experience. *PLoS Biology*, 8(11).

Tsutsui, Y., 1995. Developmental disorders of the mouse brain induced by murine cytomegalovirus: animal models for congenital cytomegalovirus infection. *Pathology international*, 45(2), pp.91–102.

Tsutsui, Y., 2009. Effects of cytomegalovirus infection on embryogenesis and brain development. *Congenital Anomalies*, 49(2), pp.47–55. Available at: http://doi.wiley.com/10.1111/j.1741-4520.2009.00222.x.

Tsutsui, Y. et al., 1991. Postnatal porencephaly induced in mouse by murine cytomegalovirus. *Acta Neuropathologica*, pp.435 – 441.

Tsutsui, Y., Kashiwai, A. & Kawamura, N., 1989. Susceptibility of brain cells to murine cytomegalovirus infection in the developing mouse brain. *Acta …*, pp.262– 270. Available at: http://www.springerlink.com/index/M5637526W2L6TH11.pdf [Accessed November 19, 2012].

Tsutsui, Y., Kawasaki, H. & Kosugi, I., 2002. Reactivation of latent cytomegalovirus infection in mouse brain cells detected after transfer to brain slice cultures. *Journal of virology*, 76(14), pp.7247–7254. Available at: http://jvi.asm.org/content/76/14/7247.short [Accessed August 24, 2012].

Tunkel, A.R. et al., 2008. The management of encephalitis: clinical practice guidelines by the Infectious Diseases Society of America. *Clinical infectious diseases : an official publication of the Infectious Diseases Society of America*, 47(3), pp.303–327.

Tyler, K.L., 2010. Emerging Viral Infections of the Central Nervous System PART1. *Neurology*, 66(8), pp.939–948.

Usta, I.M., Adra, a. M. & Nassar, a. H., 2007. Ultrasonographic diagnosis of fetal seizures: A case report and review of the literature. *BJOG: An International Journal of Obstetrics and Gynaecology*, 114(8), pp.1031–1033.

Vauzour, D., Martinsen, A. & Layé, S., 2015. Neuroinflammatory processes in cognitive disorders: Is there a role for flavonoids and n-3 polyunsaturated fatty acids in counteracting their detrimental effects? *Neurochemistry International*, 89, pp.63–74. Available at: http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0197018615300322.

Vezzani, A. & Viviani, B., 2015. Neuropharmacology Neuromodulatory properties of in fl ammatory cytokines and their impact on neuronal excitability. , 96, pp.70–82.

Visentin, S. et al., 2012. Early primary cytomegalovirus infection in pregnancy: Maternal hyperimmunoglobulin therapy improves outcomes among infants at 1 year of age. *Clinical Infectious Diseases*, 55(4), pp.497–503.

Viswanathan, K. et al., 2011. BST2/Tetherin Enhances Entry of Human Cytomegalovirus W. J. Britt, ed. *PLoS Pathogens*, 7(11), p.e1002332. Available at: http://dx.plos.org/10.1371/journal.ppat.1002332 [Accessed November 4, 2011].

Vomaske, J. et al., 2012. Cytomegalovirus CC chemokine promotes immune cell migration. *Journal of virology*, 86(21), pp.11833–44. Available at: http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=3486311&tool=pmcentrez&rendertype=abstract [Accessed January 30, 2014].

Walter-Nicolet, E. et al., 2011. Congenital cytomegalovirus infection manifesting as neonatal

persistent pulmonary hypertension: Report of two cases. *Pulmonary Medicine*, 2011.

Wang, D.D. et al., 2012. Minocycline- and tetracycline-class antibiotics are protective against partial seizures in vivo. *Epilepsy Behav*, 24(3), pp.314–318. Available at: http://dx.doi.org/10.1016/j.yebeh.2012.03.035.

Wang, X. et al., 2003. Epidermal growth factor receptor is a cellular receptor for human cytomegalovirus. *Nature*, 424(July).

Wang, X. et al., 2005. Integrin alphavbeta3 is a coreceptor for human cytomegalovirus. *Nature medicine*, 11(5), pp.515–21. Available at: http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=1904494&tool=pmcentrez&rendertype=abstract [Accessed August 2, 2011].

Webster, W.S., 1998. Teratogen update: Congenital rubella. *Teratology*, 58(1), pp.13–23.

White, A.L., Hedlund, G.L. & Bale, J.F., 2014. Congenital cytomegalovirus infection and brain clefting. *Pediatric Neurology*, 50(3), pp.218–223. Available at: http://dx.doi.org/10.1016/j.pediatrneurol.2013.11.005.

Woodall, C.J. et al., 1994. Sequences specific for enterovirus detected in spinal cord from patients with motor neurone disease. *BMJ (Clinical research ed.)*, 308(6943), pp.1541–3. Available at: http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=2540520&tool=pmcentrez&rendertype=abstract.

Wu, C. a et al., 2011. Transmission of murine cytomegalovirus in breast milk: a model of natural infection in neonates. *Journal of virology*, 85(10), pp.5115–5124.

Yamashita, Y. et al., 2003. Possible association between congenital cytomegalovirus infection and autistic disorder. *J Autism Dev Disord*, 33(4), pp.455–459. Available at: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=12959425.

Yatim, N. & Albert, M.L., 2011. Dying to Replicate: The Orchestration of the Viral Life Cycle, Cell Death Pathways, and Immunity. *Immunity*, 35(4), pp.478–490. Available at: http://dx.doi.org/10.1016/j.immuni.2011.10.010.

Yolken, R.H. & Torrey, E.F., 1995. Viruses , Schizophrenia , and Bipolar Disorder. , 8(1), pp.131–145.

Zhan, Y. et al., 2014. Deficient neuron-microglia signaling results in impaired functional brain connectivity and social behavior. *Nature Neuroscience*, 17(3), pp.400–406. Available at: http://www.nature.com/doifinder/10.1038/nn.3641.

Zhou, S. et al., 2004. Differential Tissue-Specific Regulation of Antiviral CD8 + T-Cell Immune Responses during Chronic Viral Infection Differential Tissue-Specific Regulation of Antiviral CD8 ♀ T-Cell Immune Responses during Chronic Viral Infection. , 78(7), pp.3578–3600.

Zusso, M. et al., 2012. Regulation of postnatal forebrain amoeboid microglial cell proliferation

and development by the transcription factor Runx1. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience*, 32(33), pp.11285–98. Available at: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22895712 [Accessed January 6, 2014].

RESUME

L'infection par le cytomégalovirus (CMV) au cours de la grossesse est fréquente et représente la première cause de pathologie neurodéveloppementale. Elle peut avoir des conséquences développementales (polymicrogyrie, microcéphalie) et neurosensorielles (surdité, épilepsie, paralysie cérébrale) sévères. En dépit de cette importance médicale, il n'existe à ce jour aucun traitement préventif ou curatif satisfaisant, et les mécanismes physiopathologiques mis en jeu, en particulier au niveau du cerveau fœtal, restent mal connus. Des découvertes récentes sur les modèles murins d'infection cérébrale par le CMV, principalement réalisées pendant la période néonatale, ont apporté des données convergentes sur la physiopathologie de ces infections cérébrales ; notamment, le rôle joué par les cellules immunitaires périphériques dans la résolution de l'infection, et l'implication du système immunitaire cérébral (SIC) au cours du processus infectieux. Cependant, les fonctions précises du SIC, plus spécifiquement de la microglie et des macrophages au cours de l'infection par le CMV *in utero* ne sont pas clairement identifiées.

Afin de compléter et préciser les résultats précédemment obtenus dans différents modèles murins, et de comprendre le rôle joué par le SIC, le premier objectif de ma thèse a consisté à mettre au point et à caractériser un nouveau modèle d'infection cérébrale par le CMV au cours du développement *in utero* chez le rat. Dans ce modèle d'infection intracérébroventriculaire, j'ai pu tout d'abord mettre en évidence par immunohistochimie et cytométrie de flux une infection préférentielle des cellules des lignées myéloïde et lymphoïde. De surcroît, l'infection s'accompagne, en plus de la dysexpression de diverses chimiokines et de l'attraction de cellules immunitaires périphériques, d'une activation microgliale précoce, notamment localisée dans les régions infectées. Dans un deuxième temps, l'étude de ce modèle, notamment au cours des stades postnataux plus tardifs, a permis de mettre en exergue un certain nombre de similitudes avec la pathologie humaine : en particulier l'existence d'une surmortalité, de crises d'épilepsie généralisées tonico-cloniques, de troubles sensorimoteurs, et d'un déficit auditif. Dans une dernière étape, j'ai pu montrer dans ce modèle qu'en agissant spécifiquement sur la microglie et les macrophages, soit par déplétion, soit en inhibant l'état d'activation de ces cellules, il était possible de prévenir l'émergence du phénotype des animaux infectés, tant sur le plan de la dissémination virale que de certaines manifestations cliniques.

Dans l'ensemble, ces résultats confirment l'altération du SIC au cours de l'infection par le CMV du cerveau en développement, et suggèrent fortement, dans ce modèle, un rôle majeur joué par le système microglie/macrophage dans l'émergence de troubles neurologiques semblables à ceux observés dans la pathologie humaine correspondante.