

UNIVERSITÉ DE LIMOGES

ÉCOLE DOCTORALE Sciences - Technologie - Santé

Faculté des Sciences et Techniques de Limoges

Année 2006

[Thèse n° 26-2006]

THÈSE

Pour l'obtention du grade de

DOCTEUR DE L'UNIVERSITÉ DE LIMOGES

Discipline : **BIOLOGIE - SCIENCES - SANTÉ**

Présentée et soutenue par

GAËL CHAMPIER

Le 26 juin 2006

**CYTOMÉGALOVIRUS HUMAIN ET ANTIVIRAUX :
SUPPORTS GÉNÉTIQUES DES RÉSISTANCES ET CIBLES DE NOUVEAUX ANTIVIRAUX**

Thèse dirigée par Madame le Docteur **SOPHIE ALAIN**

présentée devant le jury composé de :

Professeur **FRANÇOIS DENIS**

Président

Professeur **HENRI AGUT**

Rapporteur

Professeur **EMMANUEL DROUET**

Rapporteur

Professeur **JEAN-CLAUDE NICOLAS**

Examineur

Docteur **SOPHIE ALAIN**

Examineur

Docteur **MARIE-CHRISTINE MAZERON**

Examineur

Docteur **SERGE BOUAZIZ**

Membre invité

Résumé :

Le cytomégalovirus est un herpesvirus responsable d'infections graves chez les personnes immunodéprimées. Les traitements disponibles, peu nombreux, s'appuient sur des inhibiteurs de l'ADN polymérase virale pUL54 : le cidofovir, le foscarnet et le ganciclovir. Le ganciclovir, utilisé en première intention pour la prévention ou le traitement des infections à cytomégalovirus, nécessite, pour être actif, d'être primo-phosphorylé par la kinase virale pUL97. Du fait de la cytotoxicité de ces agents, de leur faible biodisponibilité et de l'émergence de résistances, de nouvelles molécules ne ciblant pas la synthèse de l'ADN viral sont en voie de développement. Il s'agit de dérivés benzimidazolés dextrogyres, le BDCRB et le TCRB, qui ciblent des protéines impliquées dans l'encapsidation de l'ADN viral (pUL56, pUL89, et pUL104), et d'un dérivé benzimidazolé lévogyre, le maribavir, qui inhibe l'exportation extranucléaire des capsides néoformées par un mécanisme impliquant la phosphotransférase pUL97 et la protéine pUL27.

Ce travail s'articule en deux axes principaux : les antiviraux actuels et les molécules en développement. Concernant les traitements actuels nous avons développé des outils de détection et d'étude des résistances. Puis nous avons appliqué ces outils à des études multicentriques, visant à définir la fréquence des résistances et le polymorphisme naturel des cibles des antiviraux actuels (pUL97 et pUL54). Ensuite, nous avons développé des modèles théoriques de la structure tridimensionnelle des domaines fonctionnels de ces enzymes afin de mieux comprendre leur fonction et d'évaluer le rôle de certaines mutations dans les résistances. Concernant les molécules antivirales en développement, nous avons utilisé le principe de génotypage développé pour les cibles des antiviraux traditionnels pour étudier le polymorphisme naturel des protéines cibles de ces molécules (pUL27, pUL56, pUL89 et pUL104). Dans un deuxième temps, nous avons analysé la conservation inter-espèces et la structure primaire de ces protéines afin de mieux comprendre leur fonction et les mécanismes moléculaires des résistances.

Mots clés : Cytomégalovirus humain, DNA polymérase, phosphotransférase, protéines d'encapsidation, résistances, antiviraux, dérivés benzimidazolés

Title: Human cytomegalovirus and antiviral drugs resistance: molecular basis of the resistance and targets of new molecules

Abstract: Drugs usually used for treatment or prophylaxis of HCMV disease lean on few inhibitors of viral DNA synthesis targeting the HCMV DNA polymerase pUL54 : ganciclovir, cidofovir and foscarnet. Because of these drugs are associated with multiple side effects and drug resistance emergence, new drugs like benzimidazole derivatives, that target the viral DNA processing, being developed. The benzimidazole D-ribonucleosides inhibit DNA packaging by a process implicating the packaging proteins pUL56 and pUL89 and the portal protein pUL104. The benzimidazole L-ribonucleosides inhibit the virion nuclear egress. Little is known about both the benzimidazole D-ribonucleosides and benzimidazole L-ribonucleosides mechanisms of action. The aim of this study was to develop fast and standardized tools for detection of HCMV drugs resistance and to study the function of the targets of these molecules and their mechanism of action.

Sommaire

Sommaire

Index des tableaux et figures

<i>Remerciements</i>	<u>1</u>
<i>Glossaire</i>	<u>4</u>
<i>Introduction générale</i>	<u>7</u>
<i>Etude bibliographique</i>	<u>9</u>
I. Le cytomegalovirus humain	<u>9</u>
1. Généralités	<u>9</u>
2. Structure du virus	<u>11</u>
3. Réplication virale	<u>16</u>
4. Réponse immunitaire	<u>24</u>
II. L'infection à CMVH	<u>26</u>
1. Epidémiologie de l'infection à CMVH	<u>26</u>
2. Physiopathologie	<u>27</u>
3. Pouvoir pathogène et manifestations cliniques	<u>29</u>
4. Diagnostic de l'infection à CMVH	<u>35</u>
III. Traitement et prévention des infections à CMVH	<u>38</u>
1. Molécules et stratégies antivirales (Tableau 5)	<u>38</u>
2. Traitements des infections à CMV	<u>47</u>
3. Vers un vaccin contre le CMV ?	<u>52</u>
4. Résistances	<u>54</u>
IV. Les principales cibles antivirales	<u>64</u>
1. Phosphotransférase pUL97	<u>64</u>
2. ADN polymérase pUL54	<u>72</u>

3. Protéine d'encapsidation pUL56	80
4. Protéine d'encapsidation pUL89	83
5. Protéine portail pUL104	84
6. Protéine pUL27	87
<i>Etude expérimentale</i>	88
<i>Objectifs</i>	89
<i>Déroulement de l'étude</i>	89
<i>Liste des publications</i>	93
I. Développement de méthodes de génotypage standardisées du gène UL97 et applications à la détection des résistances et à l'étude du polymorphisme et des domaines fonctionnels de pUL97	95
1. Développement et analyse comparative de méthodes de séquençage du gène UL97 et application à une étude du génotype de résistance de souches issues d'une cohorte de patients (Article-1)	95
2. Détection de résistances au ganciclovir après prophylaxie par valaciclovir chez des receveurs de rein présentant une infection à cytomégalovirus (Article-2)	100
3. Etude d'une nouvelle mutation de résistance au ganciclovir sélectionnée par prophylaxie au valaciclovir et traitement de courte durée par ganciclovir après transplantation rénale (Article-3)	102
II. Développement d'outils d'étude du polymorphisme naturel, des résistances, et de l'activité de la polymérase virale pUL54 et applications	105
1. Etude de la variabilité inter-espèces et intra-espèces des régions localisées entre les régions δ -C et II et entre les régions III et I de la polymérase pUL54 (Article-4)	112
2. Analyse du génotype et du phénotype de souches séquentielles issues de patients infectés par le VIH et traités par ganciclovir et par foscarnet pour atteintes neurologiques à CMV (Article-5)	114
3. Développement d'un nouveau test non radioactif de mesure de l'activité enzymatique de l'ADN polymérase pUL54 du cytomégalovirus (Article-6)	117

4. Analyse de l'effet de la mutation N495K sur la résistance au foscarnet et sur l'activité de l'ADN polymérase virale pUL54 (Article-7)_____125

III. Etude du polymorphisme naturel et analyse fonctionnelle des cibles des dérivés benzimidazolés : pUL56, pUL89 et pUL104, d'une part, et pUL27 d'autre part _____129

1. Analyse du polymorphisme naturel et de la structure primaire de la protéine d'encapsulation pUL56 ; étude du rôle du doigt de zinc N-terminal dans la fonction de la protéine et dans le mécanisme d'action des dérivés benzimidazolés D-ribonucléosidiques (Article-8)_____130

2. Analyse du polymorphisme naturel et de la structure primaire de la protéine d'encapsulation pUL89 ; Construction d'un modèle théorique du site catalytique ATPasique (Article-9)_____151

3. Analyse du polymorphisme naturel et de la conservation inter-espèces de la protéine portail pUL104_____154

4. Analyse du polymorphisme naturel et de la conservation inter-espèces de la protéine pUL27_____161

Discussion _____170

Conclusion - Perspectives _____179

Annexe _____180

Références Bibliographiques _____182

Remerciements

Au terme de ce travail, je tiens à remercier :

➡ Monsieur le Professeur **François Denis**, pour m'avoir accueilli dans son laboratoire, soutenu tout au long de ce travail et fait l'honneur de présider le jury de cette thèse. Qu'il trouve ici, l'expression de ma profonde gratitude ;

➡ Madame le Docteur **Sophie Alain**, pour m'avoir confié ce travail et fait bénéficier de ses compétences dans cette démarche scientifique mais aussi pour m'avoir accordé sa confiance, sa sympathie, son soutien, ainsi que son aide chaleureuse. Qu'elle soit assurée de mon amitié, de mes profonds remerciements, et de l'estime que je lui porte ;

➡ L'ensemble des organismes qui ont participé au financement de ce travail : l'**Université de Limoges**, la **Région Limousin**, le **Centre Nation de Référence Cytomégalo virus**, la **Fondation pour la Recherche Médicale**, l'**Association d'Etude et de Recherche en Infectiologie (ASSERIL)** et l'**Association Nationale de Recherche sur le SIDA (ANRS)**. Que Monsieur le Professeur **Jean-Michel Vallat**, Responsable de l'antenne locale de la Fondation pour la Recherche Médicale trouve ici l'assurance de ma profonde gratitude pour son soutien et sa confiance ;

➡ Madame le Professeur **Marie-Cécile Ploy**, que je remercie pour son soutien, son dynamisme, sa sympathie et sa confiance. Qu'elle trouve ici l'assurance de mon amitié et de ma reconnaissance ;

➡ Madame le Docteur **Marie-Christine Mazon**, pour m'avoir fait l'honneur d'accepter d'être examinateur de ce travail et pour son soutien, ses conseils précieux et sa disponibilité tout au long de ce travail. Qu'elle trouve ici l'assurance de ma reconnaissance et de mon profond respect ;

➡ Monsieur le Docteur **Serge Bouaziz**, qui m'a fait l'honneur d'accepter d'être examinateur de ce travail et pour son soutien, son aide précieuse, ses encouragements et sa disponibilité tout au long de notre collaboration. Qu'il soit assuré de mon amitié, de ma profonde gratitude et de ma reconnaissance ;

➡ Monsieur le Professeur **Henri Agut**, qui m'a fait l'honneur d'accepter d'être rapporteur de ce travail. Qu'il trouve ici l'assurance de mon respect ;

➡ Monsieur le Professeur **Emmanuel Drouet**, pour m'avoir fait l'honneur d'être rapporteur de ce travail. Qu'il trouve ici l'assurance de ma gratitude ;

➡ Monsieur le Professeur **Jean-Claude Nicolas**, qui m'a fait l'honneur d'accepter d'être examinateur de ce travail. Qu'il trouve ici l'assurance de ma gratitude ;

➡ L'ensemble des personnes qui ont participé à ce travail : **Marie-Claire Baclet, Alexandra Ducancelle, Anthony Couvreur, Stéphanie Stuppler, Rachel Guiton, Sébastien Hantz, Nadine Cogné, Laurène Trape, Emmanuel Decroisette, Julien Pestourie, Armelle Rametti...** pour leur soutien, leur sympathie, et leur aide précieuse. Qu'ils trouvent ici l'assurance de mon amitié et de ma reconnaissance ;

➡ L'ensemble des membres de l'EA3175 et du laboratoire de Virologie. Qu'ils soient chaleureusement remerciés pour leur excellent accueil, pour avoir supporté mes humeurs et mes craintes, pour leur sympathie et leurs précieux conseils, avec une attention particulière pour **Martine Gatet** ;

➡ Monsieur le Professeur **Michel Cogné**, et toute l'équipe de B Cell Design, pour la confiance qu'ils me portent et pour m'avoir accueilli dans leur équipe à l'issue de ce travail. J'espère être digne de leur confiance. Qu'ils trouvent ici l'expression de ma profonde gratitude.

*A mes parents
pour leur aide précieuse et leur optimisme*

*A mes frères et sœurs
Pour leur soutien*

*A mes amis
pour avoir supporté mes humeurs tout au long de ce travail et
pour les bons moments passés
en leur compagnie :*

*Amélie, Anne, Armelle, Carine, Cécile, Didier, Fabrice,
Jean-Christophe, Jérôme, Karine, Laurence,
Neely, Stéphane, Vanessa,*

...

*avec une pensée particulière pour Jean-Christophe, Armelle,
Fabrice, Carinette, Laurence et Didier*

Glossaire

Abréviations	Définitions
A	Adénine/adénosine
ADN	Acide désoxyribonucléique
ACV	Aciclovir
ANRS	Association Nationale de Recherche sur le SIDA
ARN	Acide ribonucléique
ARNm	ARN messagers
ATP	Adénosine Triphosphate
C	Cytidine/Cytosine
CDV	Cidofovir
CI50	Concentration Inhibitrice 50 %
Cmax	Concentration maximale plasmatique
CMV	Cytomégalovirus
CMVH	Cytomégalovirus humain
Cy5.0/Cy5	Cyanine 5
Cy5.5/Cy5.5	Cyanine 5.5
D	Donneur
dATP	Désoxyadénosine Triphosphate
dCTP	Désoxycytosine Triphosphate
dGTP	Désoxyguanosine Triphosphate
DMSO	Diméthylsulfoxyde
dNTP	Désoxynucléotide Triphosphate
DO	Densité Optique
dTTP	Désoxythymidine Triphosphate
dXTP	Désoxynucléotide Triphosphate
EBV	Epstein Barr Virus
ECP	Effet Cytopathique
ELISA	Enzyme Linked Immuno Sorbent Assay
g	Grammes
G	Guanine

Abréviations

Définitions

GCV	Ganciclovir
GST	Glutathion S_Transférase
G+C %	Pourcentage de base guanine et cytidine
HHV	<i>Human herpes virus</i>
HSV	<i>Herpes simplex virus</i>
IPTG	Isopropyl-thio-β-D-galactoside
Ig	Immunoglobuline
IgG	Immunoglobuline G
IgM	Immunoglobuline M
INF	Interféron
IS50	Indice de sensibilité à 50%
Kb	Kilobase
KDa	KiloDalton
Kpb	Kilopaire de Bases
LBA	Liquide broncho alvéolaire
LCR	Liquide céphalorachidien
LIR/IRL	Long Internal Repeat
LTR/TRL	Long Terminal Repeat
M	Molaire (mole par litre)
ml	Millilitre
ng	Nanogramme
nm	Nanomètre
nM	NanoMolaire
pb	paires de bases
PBS	Phosphate Buffer Saline (tampon phosphate)
PCR	Polymerase Chain Reaction
PFA	Foscarnet
pM	Picomolaire
Pol	Polymérase
R	Receceur
rpm	Rotation par minute

Abréviations**Définitions**

SDS	Sodium-dodecyl-sulfate
SIR/IRS	Short Internal Repeat
SIDA / AIDS	Syndrome d'immunodéficience acquise
Sec	Secondes
STR/SRL	Short Terminal Repeat
T	Thymidine
TBE	Tris Borate EDTA
TBS	Tris Buffer Saline
UL	Segment unique long (unique long)
US	Segment unique short (unique court)
UV	Ultra Violet
ValGCV	Valganciclovir
VIH	Virus de l'immunodéficience humaine
VZV	Virus de la varicelle et du zona
X-Gal	5-bromo-4-chloro-3-indolyl- β -Galactopyrannoside
μg	Microgramme
μl	Microlitre
μM	Micromolaire
$^{\circ}$C	Degré Celsius

Introduction générale

Le cytomégalo­virus humain, CMVH, est un virus très répandu qui infecte en France au moins la moitié des individus. Les infections sont souvent inapparentes mais cet agent peut être à l'origine d'infections graves notamment chez les immunodéprimés. Il représente un pathogène majeur après transplantation et la première cause d'infection congénitale virale. L'arsenal thérapeutique disponible en clinique contre le CMVH se résume actuellement à trois inhibiteurs de l'ADN polymérase virale pUL54 : le ganciclovir, GCV qui nécessite une activation par la kinase virale pUL97, le cidofovir, CDV, et le foscarnet, PFA. A ces molécules il faut ajouter le valganciclovir, prodrogue du ganciclovir, et le valaciclovir, prodrogue de l'aciclovir, qui est inefficace en traitement curatif et est réservé à la prophylaxie. Ces traitements ciblent la réplication de l'ADN viral et sont sans effet sur le virus latent. Ils sont administrés en cures prolongées, souvent à posologie réduite, tant que l'immunodépression persiste. Leur efficacité est limitée par leur toxicité rénale et hématologique et par l'émergence, après 3 à 9 mois de traitement, de souches virales progressivement résistantes à ces molécules du fait de l'apparition de mutations au sein des gènes *UL97* et *UL54*.

Afin de pallier les problèmes causés par la toxicité induite par ces molécules et par l'émergence de souches résistantes, de nouveaux antiviraux ayant pour cible, non plus la réplication de l'ADN viral, mais sa maturation, sont en développement. Le BDCRB, le TCRB et leurs dérivés, sont des dérivés benzimidazolés D-ribonucléosides qui inhibent l'encapsidation de l'ADN viral en ciblant spécifiquement les protéines pUL56, pUL89 et pUL104 qui interviennent dans le clivage et la translocation de l'ADN viral dans les capsides. Le maribavir, un dérivé benzimidazolé L-ribonucléoside, inhibe l'exportation extranucléaire des capsides en ciblant spécifiquement l'activité kinase de la phosphotransférase pUL97 et la protéine virale pUL27 par un mécanisme inconnu.

Lorsque nous avons commencé nos travaux, aucun test sensible et standardisé permettant un recensement exhaustif des mutations de résistance aux antiviraux n'était disponible. Si les domaines fonctionnels de pUL97 et pUL54 étaient connus, le rôle particulier de pUL97 dans

le cycle viral était encore mal défini. L'étude des mécanismes d'action des dérivés benzimidazolés en était à ses premiers développements.

Dans ce contexte, notre premier objectif a été de développer des tests standardisés permettant la détection précoce et l'étude de l'émergence des résistances du cytomégalovirus aux antiviraux dans ces différentes situations cliniques. Par ailleurs, en amont de la mise à disposition des nouveaux antiviraux, nous avons appliqué ces méthodes à l'étude du polymorphisme et des domaines fonctionnels des protéines impliquées, ce qui nous a conduit à nous intéresser plus particulièrement aux domaines fonctionnels des terminases pUL56 et pUL89 et leurs interactions avec les benzimidazolés.

Etude bibliographique

Le cytomégalovirus est un herpèsvirus ubiquitaire peu pathogène dans la population générale. Cependant, l'infection à cytomégalovirus (CMV) est préoccupante en pratique clinique à plus d'un titre. Généralement asymptomatique chez les sujets immunocompétents, elle peut engendrer des manifestations cliniques graves chez les sujets immunodéprimés, le fœtus ou le nouveau-né. Première cause d'infection congénitale virale, et pathologie opportuniste majeure chez les personnes immunodéprimées, sa prise en charge reste souvent difficile et les traitements disponibles sont peu nombreux. Après transplantation d'organe ou de cellules souches hématopoïétiques, la gravité des infections à CMV et leur retentissement sur l'issue de la greffe justifie la mise en œuvre de traitements préventifs. Bien que son incidence ait considérablement diminué chez les patients infectés par le virus de l'immunodéficience humaine (VIH) du fait de la reconstitution immunitaire liée au développement des trithérapies antirétrovirales, la prise en charge de l'infection chez les patients au stade sida reste difficile.

IV. Le cytomégalovirus humain

1. Généralités

a) Le virus

Pour revue Alain et Mazon 2001 ; Pass 2004.

Le cytomégalovirus humain (CMVH) ou herpèsvirus humain 5 appartient à la famille des Herpesviridae, sous-famille des betaherpesvirinae. Comme tous les β -herpèsvirus, il se caractérise par une étroite spécificité d'hôte, un cycle répliatif long, et sa capacité à persister à l'état latent dans de nombreux tissus tels que les monocytes du sang périphérique, les cellules souches hématopoïétiques de la moelle osseuse, ou les tissus glandulaires (Meyerson, Hackman et al. 1984; Schrier, Nelson et al. 1985). Après la primo-infection, des réinfections par une souche exogène ou des réactivations de la souche endogène peuvent survenir. Le cytomégalovirus est ubiquitaire mais la séroprévalence varie de 50 % à 100 % de la population selon le niveau socioéconomique (Ho 1990).

b) Historique

En 1904, Jesionek et Kielemenoglou décrivent pour la première fois la présence de cellules volumineuses à inclusions intranucléaires et cytoplasmiques (inclusions pseudo-protozoaires) dans les poumons, le foie et les reins d'enfants mort-nés (Jesionek and Kielemenoglou 1904). C'est en 1921 que Goodpasture et Talbot proposent le terme de cytomégalie pour désigner cette maladie. Quelques années plus tard, Cole et Kuttner envisagent l'hypothèse d'une étiologie virale de l'affection alors nommée maladie des inclusions cytomégaliqes (MIC) (Cole and Kuttner 1926). Cependant, l'agent responsable de la maladie ne sera isolé sur des fibroblastes humains qu'en 1956 par trois équipes distinctes (Rowe, Hartley *et al.* 1956; Smith 1956; Weller, Hanshaw *et al.* 1960). Weller propose dès 1960 de nommer cet agent cytomégalovirus (Dussaix and Brossard 1996). L'étude structurale et génomique du virus a par la suite permis de le classer dans la famille des *Herpesviridae*.

c) Classification

Les herpesvirus humains sont classés en trois sous familles selon la structure de leur génome viral, et les modalités du cycle répliatif. La classification des herpesvirus est présentée dans le tableau 1.

Sous famille	Virus	Nom usuel	Taille du génome	% G+C	Culture cellulaire	Site de latence
α herpesvirinae	HHV-1	HSV-1	152 kpb	67	Nombreux systèmes cellulaires	Ganglions sensitifs
	HHV-2	HSV-1	152 kpb	69		
	HHV-3	VZV	126 kpb	46	Fibroblastes humains	
β herpesvirinae	HHV-5	HCMV	229 kpb	57	Fibroblastes humains	Cellules hématopoïétiques glandulaires et épithéliales
	HHV-6	HHV-6	140-170 kpb	43	Lymphoblastes et lymphocytes humains	
	HHV-7	HHV-7	145-153 kpb	36		
γ herpesvirinae	HHV-4	EBV	172 kpb	60	Lignées cellulaires de lymphocytes B	Lymphocytes B et glandes salivaires
	HHV-8	HHV-8	140 kpb	54		Lymphocytes

Tableau 1 : Classification des herpesvirus humains

HHV : Human Herpes Virus HSV : Human Herpes simplex Virus ; VZV : Varicella zooster Virus ; EBV : Epstein Barr Virus.

2. Structure et particules virales : capsid, enveloppe et tégment

a) Structure du virus

La structure du virus est commune aux autres membres de la famille des Herpesviridae. Le diamètre du virion varie entre 150 et 200 nm. Il est constitué d'une nucléocapside icosaédrique de 100 nm de diamètre constituée de 162 capsomères séparées de l'enveloppe glycoprotéique par une substance amorphe phosphoprotéique ou tégment (figure 1). Les glycoprotéines de l'enveloppe sont ancrées dans une membrane phospholipidique d'origine cellulaire et émergent sous forme de spicules à la surface du virion.

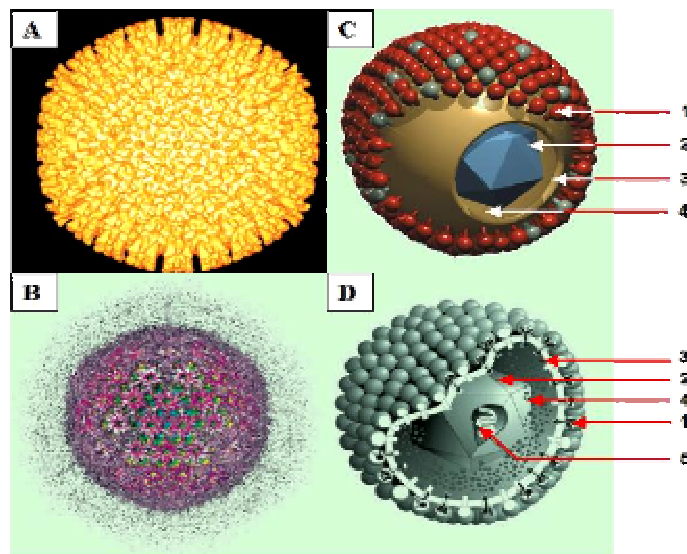


Figure 1 : Structure du CMVH (Gandhi et Kanna, 2004)

A, B : Représentation du virion de CMVH à partir d'une photographie en microscopie électronique à balayage. C, D : Structure schématique du CMVH et des β -herpesvirinae ; 1 : Enveloppe glycoprotéique constituée des protéines gB, gH, gM/N (glycoprotéine B, H, M et N) ; 2 : Capside icosaédrique ; 3 : Membrane phospholipidique d'origine cellulaire ; 4 : Tégument ; 5 : Génome linéaire bicaténaire.

Les protéines de structure du virus sont divisées en trois grandes catégories suivant leur localisation dans le virion :

❖ Les protéines de capsid

(Mocarski and Tan Courcelle 2004)

La capsid du CMVH est constituée de 7 protéines :

➤ La protéine pUL86 aussi nommée protéine majeure de capsid, MCP (*Major Capsid Protein*) est le constituant principal des pentamères et

hexamères qui sont à la base de la structure icosaédrique de la capsid. Ce polypeptide de 1370 acides aminés est l'une des protéines les plus conservées chez les herpèsvirus.

➤ La protéine pUL85 est une protéine mineure de capsid, mCP (*minor Capsid Protein*). Située à l'intérieur de la capsid, elle est constituée de 306 acides aminés et permet l'ancrage de l'ADN à la capsid.

Les protéines MCP et mCP sont les éléments les plus abondants de la capsid.

➤ La protéine mineure de fixation de la capsid codée par le gène *UL46* ou protéine mC-BP (*minor Capsid-Binding Protein*), est un polypeptide de 290 acides aminés. Elle se présente majoritairement sous forme de triplex et assure le maintien des pentamères et hexamères.

➤ La petite protéine de capsid, SCP (Smallest Capsid Protein) codée par le gène *UL48.5* est aussi nommée protéine UL48/49. Cette protéine de 75 résidus acides aminés participerait à la cohésion de la capsid en tapissant les extrémités des hexamères.

➤ Trois protéines dérivent du peptide de 708 acides aminés codés par le gène *UL80*. La protéine pUL80 génère, après trois clivages post-traductionnels des protéines assurant des fonctions distinctes mais complémentaires au sein de la capsid. La protéine pUL80.5 ou protéine AP (*Assembly Protein*) est constituée de la portion C-terminale de pUL80 suite à un clivage contrôlé par la protéase assembleine. L'assembleine ou pUL80a est constituée de l'extrémité N-Terminale de pUL80 libérée par un clivage autocatalytique. Un troisième clivage permet l'inhibition de l'activité protéasique de pUL80a. Ce mécanisme complexe de maturation des dérivés de pUL80 aboutit à la formation d'un constituant majeur de la capsid : la protéine AP. Cette dernière constitue une structure en anneau au sein de la capsid qui aurait un rôle dans l'étape d'encapsidation de l'ADN viral.

❖ *Les protéines de l'enveloppe*

L'enveloppe est principalement constituée de 8 glycoprotéines dont les mieux connues sont les glycoprotéines B, H, M/N, L et 48 (respectivement notées gB, gH, gM/N, gL et gp48). Ces protéines se regroupent en quelques complexes notés gC. Elles sont relativement bien conservées chez les herpèsvirus et portent pour certaines des épitopes spécifiques de souches. Les principales glycoprotéines sont gB (gpUL55) et gH (gpUL75) qui permettent la fixation spécifique du virus aux récepteurs des cellules hôtes au cours de la réplication virale. La glycoprotéine gB est très immunogène et constitue une cible majeure pour les anticorps

neutralisants. Durant l'infection virale, cette protéine est ainsi la cible privilégiée des cellules CD8+ et CD4+ (Pass 2004).

❖ *Les protéines du tégment*

Parmi la vingtaine de phosphoprotéines décrites au sein du tégment, deux protéines très immunogènes semblent jouer un rôle primordial dans la régulation des gènes viraux et dans le contrôle du métabolisme cellulaire au cours de la réplication virale. Il s'agit des protéines pp150 ou ppUL32 et pp65 ou ppUL83. La protéine ppUL83 est d'ailleurs retrouvée dans le noyau immédiatement après l'infection virale et s'associe à la matrice nucléaire durant les stades tardifs de la réplication. Cette dernière représente 95 % des protéines du tégment.

Les protéines ppUL99 (pp28), ppUL82 (pp71), ppUL98a et pUL56 comptent aussi parmi les protéines du tégment. La protéine pUL56 intervient avec pUL89 dans le processus d'encapsidation de l'ADN viral d'où leur dénomination de protéines d'encapsidation. La phosphoprotéine pp82 est un transactivateur des gènes très précoces. Elle est apportée par le virion dans la cellule où elle active la réplication virale en déclenchant la transcription et la traduction en chaîne des gènes viraux.

b) Structure du génome

Le CMVH possède le génome le plus long et le plus complexe de tous les Herpesviridae avec un ADN linéaire bicaténaire de 229 354 pb soit près de 155.10^6 Da pour la souche de référence AD169 (ATCC, VR-538), dont le génome a été entièrement séquencé (Kouzarides, Bankier et al. 1986). Le taux de G+C est de 57 %. Ce génome est organisé en deux segments uniques : d'une part un segment unique long, U_L, de 115.10^6 Da correspondant à 82 % du génome qui comporte 132 cadres ouverts de lecture (U_L1 à U_L132), et d'autre part, un segment unique court, U_S, de 36.10^6 Da comportant 34 cadres ouverts de lecture (U_S1 à U_S34). Chacun de ces segments est flanqué, à ses extrémités, de séquences répétées et inversées : LTR (*Long Terminal Repeat*) et STR (*Short Terminal Repeat*), aussi nommées TRL et TRS, aux extrémités du génome, LIR (*Long Internal Repeat*) et SIR (*Short Internal Repeat*), aussi nommées IRL et IRS, à l'intersection des deux segments comme représenté figure 2. L'étude du génome des herpes virus a montré l'existence, dans le segment unique long, de sept groupes de gènes conservés notés I à VII. L'origine lytique de réplication de l'ADN viral (oriLyt) se trouve aussi dans le segment U_S à proximité de l'extrémité du groupe II.

Le génome contient à ses deux extrémités et entre les éléments IRL et IRS des signaux d’empaquetage ou séquences *pac* (*cis-acting packaging element*) qui sont impliqués dans l’encapsidation de l’ADN viral et permettent de délimiter les unités de génomes lors de l’étape de réplication d’ADN.

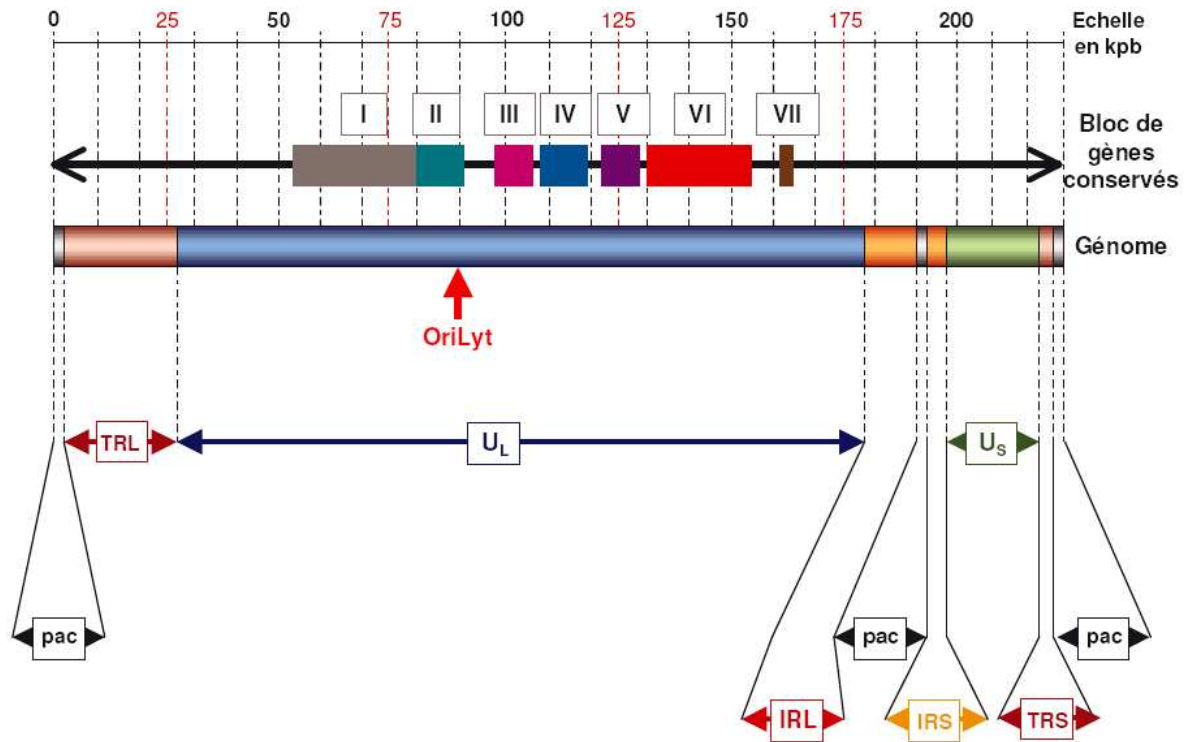


Figure 2 : Génome du CMVH

Le génome du CMVH est constitué de 2 segments uniques long (U_L) et court (U_S), flanqués de séquences répétées et inversées TRL et TRS, de part et d’autre du génome, de séquences IRL et IRS entre les segments. Cette structure est elle-même flanquée de signaux d’empaquetage ou séquences *pac* (de part et d’autre du génome et entre IRL et IRS). Ces séquences sont impliquées dans l’encapsidation de l’ADN viral. La première ligne indique l’échelle en kpb ; la seconde présente les 7 groupes de gènes conservés dans la région U_L . Enfin, la flèche rouge indique le site oriLyt qui correspond à l’origine lytique de réplication de l’ADN.

Le génome, étudié sur la souche de référence AD169, contient 208 cadres ouverts de lecture numérotés en fonction de leur localisation dans les régions U_L et U_S . Ces gènes sont exprimés en cascade au cours du cycle viral ; ils sont classés en trois grands groupes correspondant aux trois phases de la transcription et de la traduction.

❖ **Les gènes très précoces** ou *Immediate Early*, IE, ou gènes α codent les protéines impliquées dans la régulation du cycle cellulaire.

Les gènes très précoces sont classés en deux catégories IE1 (20 % des gènes IE) et IE2 (80 % des gènes IE). Les gènes IE codent les protéines très précoces telles IE86, IE72 et IE55 qui sont impliquées dans l'activation et la répression des gènes viraux et cellulaires. Ils sont activés par une phosphoprotéine du tégument : la protéine pp71 (ppUL82).

❖ **Les gènes précoces** ou *Early*, E, ou gènes β codent les protéines intervenant dans la réplication virale.

La phase précoce correspond à la synthèse des protéines impliquées dans la réplication du génome, dont l'ADN polymérase pUL54, la protéine accessoire pUL44, la phosphoprotéine pUL97, les trois sous-unités du complexe primase/hélicase, pUL70, pUL102 et pUL105 et la DNase virale.

Certains gènes précoces codent des analogues de gènes cellulaires et des protéines interagissant avec le système immunitaire. Ces protéines interviendraient dans l'échappement du virus à la pression immunitaire ; le CMVH ne se contente ainsi pas de profiter de l'immunodépression, mais participerait à son installation (Reddhase 2000; Gandhi and Khanna 2004). Les gènes codant les glycoprotéines gpTRL11 et gpUL118 sont des récepteurs des IgG Fc mais leur fonction est encore inconnue. L'ORF *UL16* code pour la glycoprotéine gpUL16 qui se fixe aux protéines MHC (MICB, ULBP1 et ULBP2), ligands naturels et activateurs des récepteurs NKG2D, prévenant ainsi du déclenchement de l'activation des cellules NK. La protéine gpUL18 se lie à LIR 1, ligand du HLA-G trouvé au niveau des trophoblastes foetaux, et jouerait ainsi un rôle *in utero*. Le transcrite du gène *UL20* (gpUL20) constitue un inhibiteur de la réponse des cellules T. La glycoprotéine gpUL27 pourrait constituer un récepteur contrôlant les effets des interférons de type I et II et jouerait un rôle dans le transit extranucléaire du virion. Les gènes *UL33* et *UL78* codent des récepteurs (gpUL33 et gpUL78) impliqués dans la dissémination virale. L'ORF *UL40* code un peptide (gpUL40) intervenant sur HLA-E qui fixe l'inhibiteur CD94/NKG2A des récepteurs des cellules NK. La protéine UL83 inhibe la dégradation des produits des gènes IE1 en réprimant l'action du protéasome. Les glycoprotéines précoces gpUL111, gpUS2, gpUS3, gpUS6 et gpUS111 réduisent l'expression des protéines MHC de classe I et II régulant ainsi la prolifération des lymphocytes. Le transcrite gpUS111 porte 25 % d'homologie avec la protéine humaine IL10. Enfin, la glycoprotéine gpUS28 pourrait participer à la dissémination virale. (*Pour revue* : Gilbert, 1996 ; Reddehase, 2000).

❖ *Les gènes tardifs* ou *Late*, L, ou gènes γ codent pour les protéines de capsid, les protéines de l'enveloppe et les protéines du tégument qui sont les protéines de structure du virion précédemment citées (Paragraphe I-2-a).

3. Réplication virale

Pour revue Colinon and Minjolle 2002; Mocarski and Tan Courcelle 2004

De très nombreuses cellules permettent la réplication du CMV dans l'organisme. Au contraire, en culture cellulaire, seuls les fibroblastes embryonnaires humains permettent de produire de grandes quantités de virus. Les lignées cellulaires humaines et animales, à l'exception d'une lignée d'astrocytome humain, et de certaines lignées trophoblastiques ne permettent pas l'obtention d'un cycle viral complet. De même, alors que le temps de doublement de la charge virale circulante chez un patient immunodéprimé est compris entre 0,5 et 2 jours, le cycle réplicatif du CMV en culture cellulaire est lent, et les premières particules virales sont détectables dans le surnageant de culture entre 48 et 72 heures pour la souche de référence AD169, ce délai pouvant se prolonger jusqu'à plusieurs semaines pour les isolats cliniques. De même, en culture cellulaire, le rendement en particules infectieuses est modéré. La plupart des particules produites restent associées aux cellules si bien que le virus contamine les cellules voisines par contiguité. Et certaines souches ne produisent que très peu de particules virales libres dans le surnageant de culture.

a) Attachement et pénétration du virus dans la cellule hôte

Pour revue Evers, Wang et al. 2004

La pénétration du virus dans la cellule-hôte est indépendante du pH, et ne fait donc pas intervenir l'endocytose. Cependant la pénétration par endocytose est possible en culture cellulaire. Le virus se fixe aux cellules hôtes au niveau de récepteurs spécifiques ancrés au niveau de la membrane phospholipidique (figure 3). Ce sont en fait les spicules glycoprotéiques formés par les glycoprotéines gB et gH qui se fixent spécifiquement sur les récepteurs membranaires EGFR et $\alpha\beta 3$. Cette fixation spécifique est facilitée par une fixation aspécifique préalable au niveau de la matrice extracellulaire, notamment à l'héparan-sulfate, à l'annexine II ou à la beta 2 microglobuline.

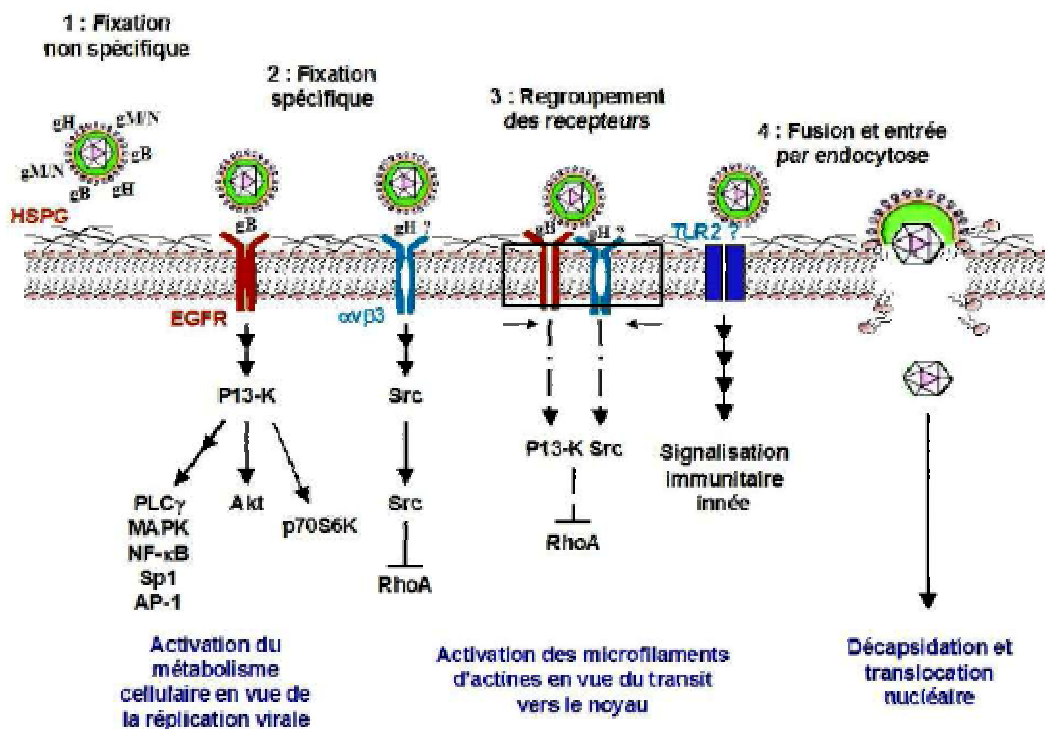


Figure 3 : Attachement et fusion du virus et activation du métabolisme cellulaire en vue de la réplication virale. D'après Evers, Wang et al. 2004

1 : Fusion non spécifique du virus au niveau des éléments de la matrice extracellulaire. 2 : Fixation spécifique des glycoprotéines d'enveloppe sur des récepteurs transmembranaires ; gB et gH se fixent respectivement aux récepteurs EGFR et $\alpha 5 \beta 1$ permettant l'activation du métabolisme cellulaire via des protéines de la cellule hôte (PLC γ , MAPK, NF κ B, Sp1 et AP-1) et l'activation des microfilaments d'actine en vue du transit vers le noyau. 3 : La fixation de gB et gH provoque un réarrangement de la membrane phospholipidique aboutissant au rapprochement des récepteurs EGFR et $\alpha 5 \beta 1$. 4 : Le regroupement des récepteurs aboutit au rapprochement virus/membrane cellulaire permettant leur fusion. Cette dernière étape provoque l'endocytose de la capsid et des protéines du tégument puis la décapsidation de l'ADN viral et sa translocation vers le noyau.

La fixation de gB et de gH sur leur récepteur respectif permet une activation très précoce du métabolisme cellulaire, avant même l'entrée du virus, faisant intervenir une activation en chaîne de protéines cellulaires dont des facteurs de transcription comme NF κ B. La fixation du virus au niveau des récepteurs déclenche aussi l'activation des protéines du cytosquelette et plus particulièrement du réseau de microfilaments d'actine qui prendra en charge le transit du virion vers le noyau. Enfin la fixation de gH et gB aux récepteurs cellulaires permet leur regroupement puis le rapprochement du virus et de la membrane phospholipidique.

Ce rapprochement permet alors l'entrée du virus après fusion des membranes virale et cellulaire. Cette endocytose aboutit au « largage » de la capside et des protéines du tégument dans le cytoplasme cellulaire. Parmi ces protéines, pp71 va déclencher la transcription et la traduction en cascade des gènes très précoces puis précoces et tardifs permettant la réplication du virus. La protéine pp65 est immédiatement dirigée vers le noyau et se fixe à la matrice nucléaire pour interagir avec le métabolisme cellulaire. Ainsi, le CMV induit une réorganisation du noyau cellulaire et de la cellule qui se traduit par l'activation des microfilaments d'actine, en vue du transit du virion vers le noyau et par une condensation de la chromatine au niveau de la membrane nucléaire. Cette réorganisation prépare la réplication de l'ADN viral.

b) Synthèse des protéines virales et réplication de l'ADN

La protéine du tégument pp71 (ppUL82) induit l'expression en cascade des gènes viraux en trois phases successives : très précoce, précoce et tardive présentées figure 4A (Stinski 1990; Pass 2004). La transcription des gènes viraux est assurée par l'ARN polymérase II cellulaire.

(1) Phase très précoce

La première phase correspond à l'expression des gènes très précoces du virus (gènes IE1 et IE2) sous contrôle d'un promoteur très puissant appelé MIEP (Major Immediate Early Promoter). Leur transcription ne requiert pas de synthèse protéique. Le promoteur MIEP comporte des sites pour différents facteurs d'activation ou de différenciation cellulaire tels que NF- κ B, NF-1, GRE (*glucocorticoid responsive element*), SRE (*serum responsive element*) ou RARE (*retinoic acid responsive element*). On comprend donc que la capacité de la cellule à se multiplier conditionne sa permissivité. Les produits des gènes IE sont des transactivateurs (positifs et négatifs) des gènes viraux et cellulaires. Ils régulent également leur propre production, et interviennent dans l'équilibre entre infection productive et infection latente. Leur expression permet le détournement du métabolisme cellulaire au profit de la réplication virale, l'inhibition de la réplication de l'ADN cellulaire et le déclenchement de la phase précoce. Le CMV bloque le cycle cellulaire de la cellule hôte en fin de phase G1 par inhibition de la transition vers la phase S (Lu and Shenk 1996; Dittmer and Mocarski 1997; Salvant, Fortunato *et al.* 1998).

(2) Phase précoce

La phase précoce correspond à l'expression des gènes E (gènes « *early* » ou gènes précoces). L'expression de ces gènes permet la production des protéines impliquées dans la synthèse de l'ADN viral. Cette synthèse est dépendante de l'origine lytique de réplication, *oriLyt*. C'est durant cette phase que l'ADN viral se circularise.

La phosphoprotéine ppUL84 jouerait un rôle primordial dans l'initiation de la réplication de l'ADN en agissant spécifiquement au niveau de la région *oriLyt*. L'initiation de la réplication de l'ADN viral par ppUL84, permet le déroulement de l'ADN par les trois sous-unités du complexe primase/hélicase, pUL70, pUL102 et pUL105. La phosphoprotéine de liaison à l'ADN simple brin ppUL57 (*single-stranded DNA Binding protein*) permet alors d'éviter la réhybridation des brins d'ADN. Ainsi, la polymérase virale pUL54 et sa protéine accessoire, pUL44 (*pUL54 associated processivity factor*) initient la synthèse de l'ADN viral selon le modèle du cercle roulant (figure 4B). L'ADN viral est ainsi produit sous forme de concatémères qui sont de longues molécules d'ADN constituées d'une succession d'unités de génome. Les quatre transcrits du cluster de gènes précoces *UL112-UL113* et le transcrit du gène *UL114* (ribonucléotide réductase, déoxyuridine triphosphatase, déoxyribonucléase et uracil glycosylase) sont aussi nécessaires à une réplication optimale de l'ADN viral (Anders and McCue 1996; Prichard, Duke *et al.* 1996; Sarisky and Hayward 1996; Pass 2004).

La fonction de toutes ces protéines permet la production d'ADN viral dès la fin de la phase précoce. En effet, la synthèse de l'ADN viral débute dès la 12^{ème} heure mais n'atteint son maximum qu'après 72 à 96 heures *in vitro* et 24 à 48 heures *in vivo*. Le délai postinfection nécessaire à l'obtention d'une synthèse maximale d'ADN est ainsi le plus long de tous les herpèsvirus (Stinski 1990).

(3) Phase tardive

La phase tardive correspond à l'expression des gènes L (gènes « *late* » ou tardifs). Les transcrits de ces gènes tardifs sont essentiellement des protéines de structure du virion. Certains gènes très précoces et précoces continuent à s'exprimer durant la phase tardive. La réplication de l'ADN viral, débutée en fin de phase précoce, se prolonge durant la phase tardive. La phase tardive correspond à la maturation de l'ADN viral, à son encapsidation dans les capsides néoformées puis à la tégmentation des virions et à leur excréation.

c) Maturation de l'ADN viral et encapsidation

(1) *Les formes isomériques du génome viral*

Le génome existe sous quatre formes isomériques résultant de l'inversion d'une ou plusieurs régions uniques du génome. Les isomères de génome ne diffèrent ainsi que par l'orientation des segments uniques longs et courts. Bien que la conséquence biologique de ce phénomène ne soit pas connue, les observations de McVoy et coll. suggèrent la proximité de ce mécanisme avec le processus d'encapsidation. Le prototype P est l'isomère possédant un génome sans inversion. Les isomères I_S et I_L résultent respectivement d'une inversion des segments U_S et U_L. Enfin, l'isomère I_{SL} est produit par l'inversion des segments U_L et U_S. La maturation et l'inversion du génome viral débutent dès la synthèse de l'ADN viral. Ce processus se poursuit tardivement dans le cycle au niveau des concatémères d'ADN jusqu'au clivage et à l'encapsidation de l'ADN viral (McVoy and Adler 1994). Il implique des séquences nommées "*séquences a*" qui se situent dans les signaux d'encapsidation et sont nécessaires et suffisantes à l'inversion. A l'occasion de l'étude des processus d'inversion et de maturation de l'ADN chez une souche murine de CMV, McVoy et son équipe ont construit un génome portant une copie supplémentaire de la *séquence a* d'orientation inversée. Ils ont alors montré que cette manipulation permettait non seulement l'inversion, mais aussi l'encapsidation et le clivage de l'isomère de génome produit. Par contre, lorsque la *séquence a* surnuméraire est orientée dans le sens indirect, seule l'encapsidation se produit (McVoy, Nixon *et al.* 1998).

(2) *Encapsidation de l'ADN viral*

Le modèle de réplication des herpèsvirus, dit du cercle roulant, aboutit à la production de concatémères d'ADN (figure 4). Chaque unité de génome est flanquée de séquences riches en nucléotides AT permettant de les délimiter. Ces signaux sont nommés séquences *pac* ou motifs *pac* (*pac* : *cis-acting packaging signal*). Ce modèle nécessite le découpage des concatémères d'ADN et leur transfert dans les capsides néoformées. L'ensemble de ce processus, nommé encapsidation ou terminaison fait appel à toute une classe de protéines : les protéines d'encapsidation ou terminases. Ce sont des complexes hétéro-oligomériques qui permettent la reconnaissance, le clivage et la translocation des unités de génome dans des capsides néoformées. Cette classe de protéines a été découverte au cours de l'étude des processus de réplication des bactériophages double-brin, et en particulier chez le

bactériophage T4 (Kemper and Janz 1976; Kemper and Garabett 1981). Cette étape se déroule à la fin du cycle de réplication du virus, d'où l'utilisation du terme de terminase pour les qualifier. Les terminases du cytomégalo virus humain : pUL51, pUL52, pUL56, pUL77, et pUL89 sont les homologues des protéines pUL32, pUL33, pUL28, pUL25 et pUL15 de l'herpès virus de type 1 (Bogner, Radsak *et al.* 1998). Outre les terminases, l'encapsidation implique la protéine portail de la capsid pUL104 qui est l'homologue de la protéine pUL6 du HHV-1. Différentes études ont montré la conservation des terminases chez les herpès virus et les bactériophages (Chee, Bankier *et al.* 1990; Beard, Taus *et al.* 2002). La connaissance de l'encapsidation de l'ADN chez les bactériophages et la conservation des terminases a permis de constituer un modèle théorique de ce processus chez le cytomégalo virus (Bogner, Radsak *et al.* 1998). La protéine pUL56, grâce à ses domaines de liaison à l'ADN, reconnaît les séquences *pac*. Sa fixation à ce niveau active le premier clivage de l'ADN et la fixation du complexe pUL56/ADN à pUL89 (Figure 4C). Puis le complexe pUL56/pUL89/ADN ainsi formé se fixe à une protéine ancrée au niveau de la capsid : la protéine portail pUL104 qui transfère l'ADN dans la capsid. Le complexe pUL56/pUL89, réalise alors le second clivage de l'ADN qui est libéré dans la capsid puis le complexe se dissocie pour permettre une nouvelle encapsidation. Ce mode d'encapsidation aboutit à la libération de trois types de particules : les virions complets, des corps denses (agrégats de protéines du tégument enveloppées) et des particules non infectieuses (capsides enveloppées contenant un génome tronqué ou dépourvu de génome) (aussi nommées particules A, B, et C).

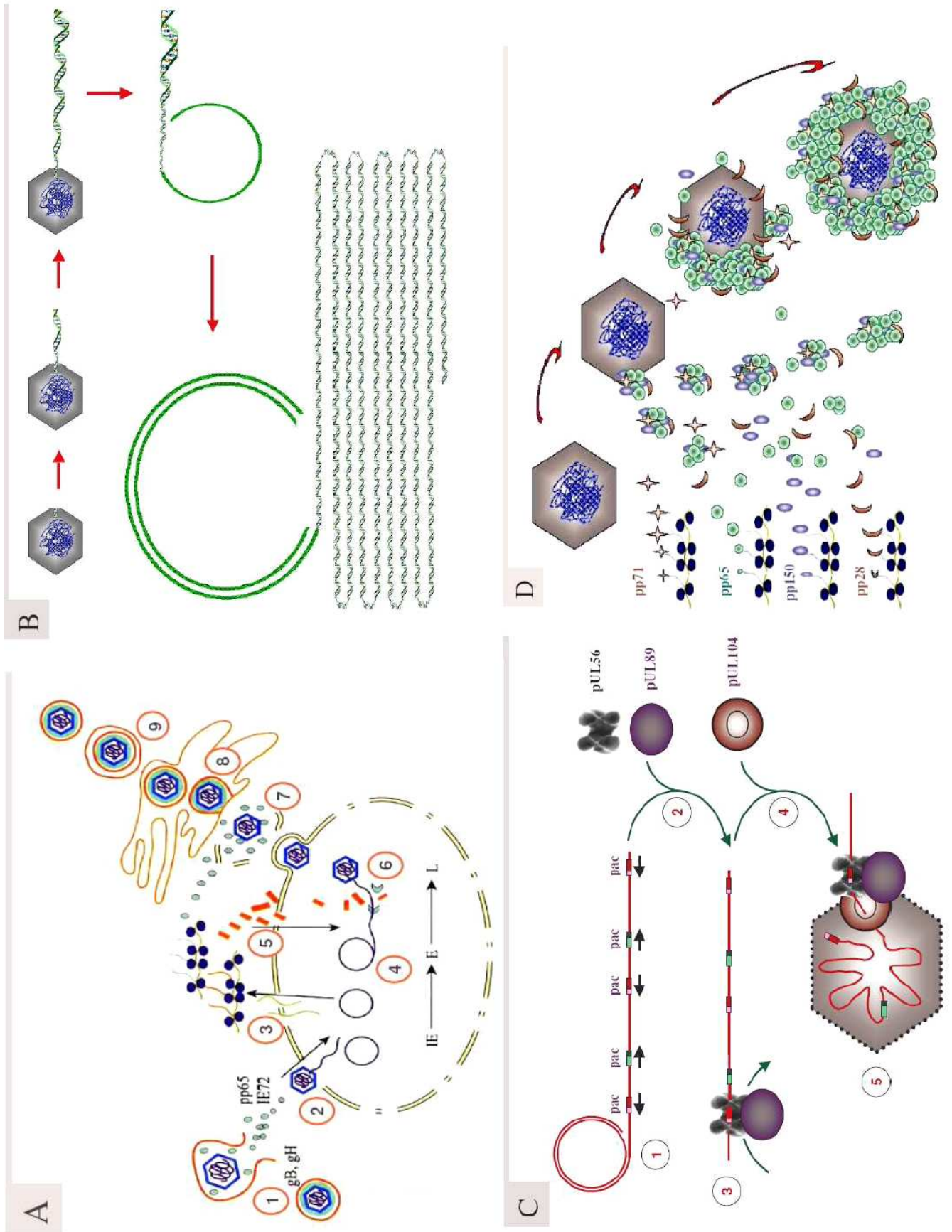


Figure 4 : Réplication virale du cytomegalovirus ; détails des étapes de la synthèse d'ADN à la tégmentation

Figure 4 : Réplication virale du cytomegalovirus ; détails des étapes de la synthèse d'ADN à la tégumentation

A : Représentation simplifiée du cycle viral. D'après Alain et Mazon, 2001. De gauche à droite sont présentées les différentes phases de la réplication virale. Le cycle viral se déroule en 8 grandes étapes : (1) Fusion du virion et entrée de la capsidie par endocytose, (2) translocation nucléaire de l'ADN viral et circularisation de l'ADN ; (3) Phase IE (Immediate Early) : expression des gènes très précoces et production des protéines transrégulatrices et Phase E (Early) : expression des gènes précoces ; (4) Réplication de l'ADN selon le modèle du cercle roulant et Phase L (Late) : expression des gènes tardifs ; (5 et 6) Maturation et encapsidation de l'ADN viral (détaillée en C) ; (7) Tégumentation : enveloppement des virions (détaillé en D) transit intracellulaire et acquisition de l'enveloppe ; (8) Sortie des virions néoformés par exocytose.

B : Réplication de l'ADN selon le modèle du cercle roulant. Après libération et translocation dans le noyau, l'ADN viral est circularisé puis répliqué en une multitude de copies assemblées bout à bout formant une longue molécule d'ADN double brin nommée concatémère. Chaque unité de génome est flanquée de séquences répétées et inversées riches en bases AT, les séquences *pac* (cis-acting packaging elements), qui sont des signaux de clivage et d'encapsidation

C : Encapsidation de l'ADN viral. D'après Bogner, 1998. La reconnaissance des séquences *pac*, par pUL56 permet le premier clivage de l'ADN et la fixation du complexe pUL56/ADN à pUL89. Puis le complexe pUL56/pUL89 se fixe à la protéine portail de la capsidie pUL104 qui transfère l'ADN dans la capsidie. Le complexe pUL56/pUL89 réalise le second clivage de l'ADN alors libéré dans la capsidie puis se dissocie pour permettre une nouvelle encapsidation.

D : Tégumentation des capsides. Les protéines du tégument pp28, pp71, pp150 et pp65 (la plus représentée), forment des amas qui s'agrègent autour des capsides pour former le tégument ; l'ensemble sera recouvert d'une enveloppe d'origine cellulaire lors de l'entrée des capsides dans le réticulum endoplasmique ou dans le Golgi puis extériorisé par exocytose.

d) Tégumentation et excréation des virions

La traduction des ARN messagers issus de l'expression des gènes tardifs permet la production des protéines du tégument dont les phosphoprotéines ppUL28, ppUL65, ppUL71 et pp150 (figure 4D). Ces protéines, et en particulier pp65 qui est la plus représentée, ont la particularité de se complexer pour former des agrégats. Ces complexes protéiques forment ainsi la substance amorphe qui s'agrège autour de la capsidie pour constituer le tégument.

Les nucléocapsides ainsi entourées du tégument s'enveloppent lors du transit extranucléaire du virus (*nuclear egress*) par bourgeonnement de la membrane nucléaire et transitent dans le réticulum endoplasmique (Mettenleiter 2002; Krosky, Back *et al.* 2003). Deux voies de sortie du virus sont envisagées. Dans la première voie, les virions enveloppés sont orientés jusqu'au Golgi à l'intérieur de vésicules constituées par la membrane du réticulum endoplasmique puis pénètrent dans le Golgi après fusion de la vésicule avec la

membrane du Golgi. Dans la deuxième voie, les virions sont désenveloppés lors de la sortie du réticulum endoplasmique puis, subissent un transit cytoplasmique et sont ré-enveloppés lors de leur entrée dans le Golgi par endocytose. Quoiqu'il en soit, les virions enveloppés sont dirigés vers la membrane cellulaire dans des vésicules constituées de la membrane golgienne et sont excrétés par exocytose environ 120 heures après l'infection en culture cellulaire (Mazeron 1997; Alain and Mazeron 2001; Pass 2004).

4. Réponse immunitaire

Pour revue Segondy 2002

L'infection à cytomégalovirus induit une réponse immunitaire qui confère une protection contre le virus. Cette protection ne permet, cependant pas, d'éliminer le virus de l'organisme.

Chez la personne immunocompétente, après une phase d'immunodépression viro-induite, s'établit un équilibre hôte/virus. Le CMV parvient à échapper suffisamment à la réponse immunitaire pour se maintenir en latence dans l'organisme, avec des phases de réplication intermittentes à la faveur d'une baisse de l'immunité de l'hôte. L'immunodépression, innée ou acquise, favorise le développement d'infections à CMV qui régressent lors de la récupération d'une immunité efficace.

La réponse à médiation cellulaire implique les cellules T-helper-CD4+ qui jouent un rôle central au cours de la réponse immunitaire. Elles activent la réponse cytotoxique des lymphocytes T CD8+, interviennent dans le contrôle de la réponse immunitaire non spécifique et activent les cellules dendritiques et la présentation des antigènes (Van Lier, Ten Berge et al. 2003). En effet, les lymphocytes T CD4+ libèrent des cytokines qui contrôlent la production, l'expansion et la maintenance des cellules T CD8+ cytotoxiques spécifiques du CMV (Ridge, RDi Rosa et al. 1998; Bourgeois, Rocha et al. 2002). L'activité des lymphocytes T CD8+ est indispensable au contrôle de la réplication virale et à l'immunité cellulaire ; elle implique de nombreux gènes viraux. Il a été montré que certains gènes situés dans le segment unique long du génome du CMV jouaient un rôle dans la réponse immunitaire et plus particulièrement dans l'activation des cellules T (Cha, Tom et al. 1996; Murphy, Yu et al. 2003). Il a ainsi été démontré que le cluster de gène UL131-128 est indispensable à une présentation efficace des antigènes aux cellules T CD8+ (Hahn, Revello et al. 2004; Germa, Percivalle et al. 2005).

Par ailleurs, la population de cellules T CD4+ et CD8+ est majoritairement dirigée spécifiquement contre le CMV au dépend de la mémoire immunitaire contre les autres agents infectieux. Ceci explique en partie comment le CMV participe à l'immunodépression et favorise l'infection par d'autres agents opportunistes (Sylwester, Mitchell et al. 2005).

De plus, le taux de cellules T CD8+ spécifiques d'un seul épitope du CMV est estimé à 0,54 à 3,77 % des cellules T CD8+. Une fraction importante de ces cellules produit des interférons gamma (INF- γ). L'analyse séquentielle des cellules T CD4+ et T CD8+ produisant des INF- γ spécifiques du CMV indique que la réponse immunitaire varie avec le temps en l'absence de symptôme. Cette variation pourrait être causée par les réactivations subcliniques du CMV (Dunn, Haney *et al.* 2002; Sester, Sester *et al.* 2002).

L'application de traitement immunosuppresseur chez les sujets transplantés inhibe l'action des cellules T soulignant le rôle primordial qu'elles occupent dans le contrôle de la réplication virale. Lors d'une primo-infection à cytomégalovirus, l'immunité spécifique conduit à l'apparition de lymphocytes T CD4+ produisant des INF- γ et à la production d'anticorps anti-CMV et de cellules T CD8+ spécifiques du CMV. Chez les sujets immunodéprimés, comme chez les immunocompétents, les lymphocytes T CD4+ produisant des INF- γ ne sont détectés que pendant une courte période dans le sang périphérique en début de phase symptomatique (Rentenaar, Gamadia *et al.* 2000). A l'inverse, aucune différence n'est observée quant aux anticorps impliqués dans l'immunité spécifique ou au niveau des populations de cellules T CD8+ spécifiques du CMV. Le pic de production des INF- γ coïncide avec le maximum de la charge virale. L'analyse de l'évolution du taux de cellules T CD4+ produisant de l'INF- γ dans le sang apparaît ainsi être un bon marqueur pour la prédiction du développement de la maladie à CMV (Rowshani, Bemelman *et al.* 2005).

La réponse humorale est importante lors de la phase virémique initiale de l'infection ou de la réinfection et joue un rôle clé dans la protection de l'hôte contre le virus. Au cours de cette phase, l'organisme produit des anticorps dirigés contre un grand nombre de protéines virales. Les anticorps détectés les plus communément lors des infections à cytomégalovirus sont dirigés contre les glycoprotéines B et H (protéines d'enveloppe pUL55 et pUL75), les phosphoprotéines du tégument pp150 et pp28 (pUL32 et pUL99), les phosphoprotéines de matrice pp65 et pp71 (pUL82 et pUL83), la phosphoprotéine pp52 (protéine accessoire pUL44) et la phosphoprotéine pp72 (transcrit du gène très précoce pUL23) (Schoppel, Kropff *et al.* 1997; Greijer, Van de Commert *et al.* 1999).

La réponse immunitaire non spécifique constitue la première ligne de défense contre l'infection à CMV. Elle associe une réponse humorale (synthèse d'interférons alpha, INF- α et bêta, INF- β , production de cytokines et chimiokines), une activation du complément et une réponse cellulaire (macrophages, polynucléaires et cellules NK (*Natural Killer*)). Les macrophages jouent un rôle majeur dans la réponse immunitaire en tant que cellules

présentatrices d'antigènes mais aussi en tant que vecteurs de dissémination de l'infection dans les tissus, puisque le virus peut persister dans les monocytes macrophages. L'immunité non spécifique seule permet ainsi de limiter le risque de développer une maladie à CMV, mais ne prévient pas l'infection elle-même.

Le cytomégalovirus a développé des mécanismes d'échappement aux défenses immunitaires de l'hôte. Durant la réplication active, le cytomégalovirus code pour des facteurs modulateurs du système immunitaire (protéines codées par les gènes précoces, (cf. paragraphe I-2-b) qui inhibent la présentation des antigènes par les protéines MHC de classes I et II (Wiertz, Jones *et al.* 1996; Le Roy, Muhlethaler-Mottet *et al.* 1999; Mocarski 2002).

V. L'infection à CMVH

1. Epidémiologie de l'infection à CMVH

L'infection à CMVH est endémique ; elle évolue sans influence saisonnière. Elle est ubiquitaire mais les populations à faible niveau de vie sont les plus concernées avec une séroprévalence pouvant atteindre 90 % dans les régions en développement alors qu'elle se limite à 50 % en Europe de l'Ouest ou en Amérique du Nord. L'infection est acquise dans la petite enfance, en particulier dans les crèches, et la prévalence des anticorps augmente jusqu'à l'entrée à l'école.

Du fait de sa fragilité dans le milieu extérieur et de sa grande spécificité d'hôte, la transmission est essentiellement interhumaine. Le cytomégalovirus perd rapidement son pouvoir infectieux à la surface d'objets ou de supports inertes ce qui nécessite, pour la transmission de l'infection, un contact étroit ou intime. Le virus est par conséquent transmis par contact étroit avec les larmes, la salive, les urines, le lait maternel, le sperme ou les sécrétions génitales de personnes répliquant activement le virus. La transmission par les tissus greffés est fréquente, puisque un donneur sur deux est séropositif et héberge le virus. La présence du virus dans les leucocytes du sang périphérique était à l'origine de transmissions par les produits sanguins labiles, avant que l'on utilise du sang déleucocyté.

Dans les pays développés, le CMV représente la première cause d'infection congénitale virale avec une transmission verticale qui touche 0,5 à 1 % des nouveau-nés. Le taux de transmission congénitale avoisine les 30 % en cas de primo-infection de la mère alors qu'il est

inférieur à 5 % dans le cas des infections secondaires. L'incidence de la primo-infection au cours de la grossesse est comprise entre 1 et 2 % (1,4 % en France). Elle atteint 57 % chez les nouveau-nés exposés au virus au cours de l'accouchement et 53 % chez les nouveau-nés nourris avec du lait infecté (Marshall, Rabalais *et al.* 1993; Rozenberg 1999; Imbert 2002). Plus de 80 % des patients infectés par le VIH sont également infectés par le CMV qui représente le principal agent pathogène opportuniste viral chez les sujets immunodéprimés. Enfin, les infections à CMV compliquent plus de 50 % des allogreffes d'organe ou de moelle osseuse (Stewart, Reef *et al.* 1995).

2. Physiopathologie

Le CMV persiste sous forme latente dans de nombreux organes et dans les lymphocytes du sang périphérique. La primo-infection est caractérisée par une virémie intraleucocytaire qui permet, dès 30 jours après la primo-infection, la dissémination du virus : lorsque le cycle lytique se produit dans les cellules de l'endothélium vasculaire, la libération de cellules infectées ou la captation de particules virales par les polynucléaires circulants permettent la dissémination virale. Le virus est alors excrété dans la plupart des fluides physiologiques : urines, sécrétions cervicales, sperme, lait, salive, larmes. Des infections secondaires dues à des réactivations du virus latent ou à des réinfections par une souche exogène peuvent aussi survenir. Plusieurs souches peuvent ainsi co-infecter un même patient et être excrétées simultanément (Erice, Chou *et al.* 1989).

a) Tropisme cellulaire

Le cytomégalovirus a pour particularité de pouvoir infecter un grand nombre de types cellulaires (cellules endothéliales, épithéliales et fibroblastiques). Cette particularité liée à la forte capacité de dissémination sanguine du virus lui permet de pouvoir infecter un grand nombre de tissus distribués de façon ubiquitaire. Des lésions typiques de l'infection à CMV ont pu être mises en évidence dans la plupart des organes : cœur, poumons, foie, reins, pancréas, glandes salivaires, appareil digestif, oeil, oreille interne, ovaires, glandes pituitaires, glandes surrénales, thyroïde, système nerveux central, vaisseaux sanguins, et la peau...

Le tropisme cellulaire du cytomégalovirus vise majoritairement les cellules épithéliales et endothéliales. Le virus a ainsi été mis en évidence dans l'endothélium des vaisseaux sanguins, au niveau des cellules épithéliales des glandes salivaires, du canal biliaire, des bronches, des

îlots de Langerhans, des ischiions rénaux, des cellules épithéliales de l'oreille interne, et dans les neurones (Myerson, Hackman *et al.* 1984; Toorkey and Carrigan 1989; Plachter, Sinzger *et al.* 1996; Sinzger and Jahn 1996).

Les cellules des muqueuses ont une position clé puisqu'elles marquent la frontière entre l'organisme et son environnement. Elles jouent ainsi un rôle primordial dans la dissémination même du virus où elles interviennent à différents stades, et en particulier lors des phases de pénétration et d'excrétion du virus. Les cellules endothéliales sont aussi impliquées dans la dissémination sanguine du virus. En effet, les cellules endothéliales sanguines sont un site où le virus se réplique fortement, libérant des particules virales ou des cellules infectées dans la circulation sanguine favorisant ainsi l'infection d'autres tissus (Gerna, Zavattoni *et al.* 1998; Gerna, Baldanti *et al.* 2004).

b) Latence

Comme tous les herpèsvirus, le cytomégalovirus persiste à l'état latent chez le sujet hôte après la primo-infection. Même si les sites de latence sont multiples, les cellules souches hématopoïétiques de la moelle osseuse, les cellules de la lignée myéloïde (granulocytes, macrophages et cellules dendritiques) et les monocytes du sang périphérique, constituent des réservoirs majeurs pour le cytomégalovirus. Il a été montré par réaction de polymérisation en chaîne (*Polymerase chain Reaction* : PCR) que le génome du cytomégalovirus était présent dans les monocytes du sang périphérique. A ce niveau, l'expression des gènes viraux se limite aux seuls gènes précoces (Dankner, McCutchan *et al.* 1990; Ibanez, Schrier *et al.* 1991; Taylor-Weideman, Sissons *et al.* 1991) hormis pour les macrophages où les gènes tardifs s'expriment également (Sinzger, Plachter *et al.* 1996). Ainsi, l'expression des gènes viraux dans les monocytes est limitée aux transcrits associés à l'état de latence (transcrits des gènes IE1) (Kondo, Kaneshima *et al.* 1994). Ces cellules expriment à leur surface des marqueurs de surface CD33, mais aussi des marqueurs spécifiques de la lignée CD14, CD15, CD1a, ou CD10 (Kondo, Kaneshima *et al.* 1994; Hahn, Jores *et al.* 1998). Les monocytes du sang périphérique facilitent la dissémination du virus. Leur différenciation en cellules dendritiques et en macrophages aboutit à la réactivation du virus latent. Or il a été montré que la différenciation des monocytes du sang périphérique en macrophages, en présence de cellules T actives, favorisait la différenciation cellulaire et donc la réactivation du virus. Ceci produit ainsi une réaction en chaîne aboutissant à l'infection active. Cependant, les facteurs intervenant dans cette réaction en chaîne sont encore mal connus (Sodeberg-Naucler, Fish *et al.* 1997; Sodeberg-Naucler and Nelson 1999).

3. Pouvoir pathogène et manifestations cliniques

Les manifestations cliniques de l'infection à CMVH varient selon le statut immunitaire du sujet. Si l'infection est souvent asymptomatique chez le sujet immunocompétent, elle peut avoir des conséquences graves chez l'immunodéprimé ou dans le cadre d'infections materno-foetales. Quelques exemples de modifications cellulaires et tissulaires sont présentés dans la figure 5 ci-dessous.

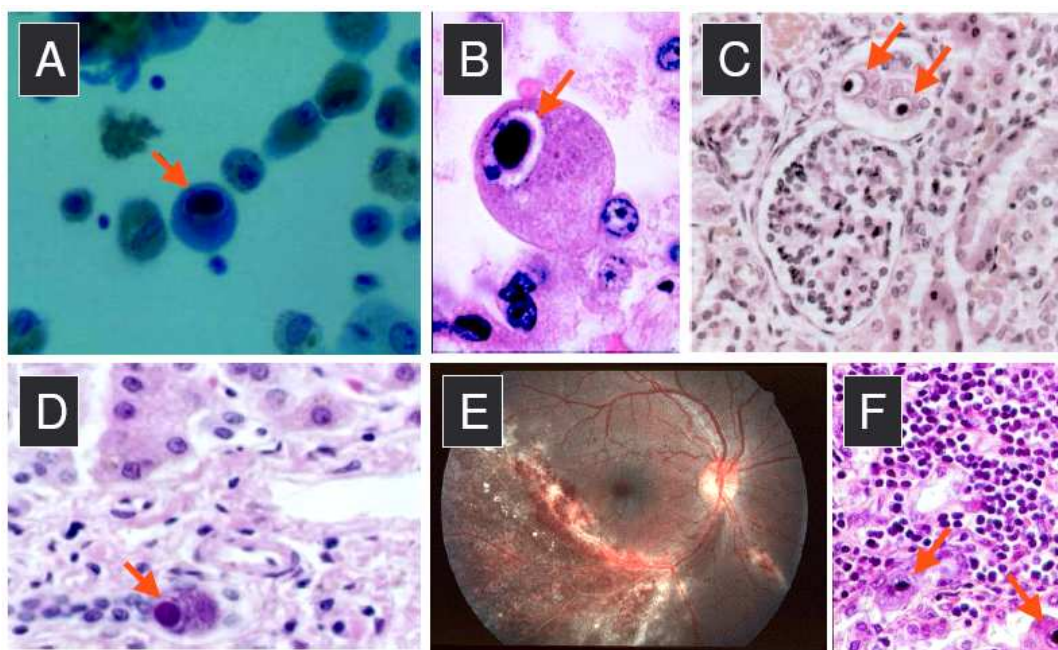


Figure 5 : Exemples de modifications cellulaires et tissulaires occasionnées par des infections à CMV

A : Lésion typique d'infection à CMV sur une biopsie de poumon : Inclusions en « œil de hibou » : cellules volumineuses, à inclusions intracellulaires séparées de la membrane nucléaire par un halo clair (flèche rouge); B, F : Inclusions en « œil de hibou » sur des biopsies de foie ; C, D : Lésions en « œil de hibou » sur des biopsies de rein ; E : Aspect au fond de l'œil des lésions rétiniennes au cours d'une rétinite à CMV avec nécrose et hémorragie.

a) Manifestations cliniques chez le sujet immunocompétent

L'infection à CMVH reste généralement asymptomatique. Cependant, dans 8 à 10 % des cas, le plus souvent à l'occasion d'une primo-infection, des manifestations cliniques peuvent apparaître.

L'infection à CMVH reste généralement asymptomatique. Cependant, dans 8 à 10 % des cas, essentiellement à l'occasion d'une primo-infection, des manifestations cliniques peuvent apparaître (Tableau 2). Chez l'adulte ou le grand enfant, la forme symptomatique la plus typique correspond à un syndrome mononucléosique. La primo-infection à CMV peut cependant aboutir à des manifestations cliniques moins fréquentes telles que des arthralgies et arthrites, colites ulcérales, pneumopathies, méningites aseptiques et myocardites (Gandhi and Khanna 2004). L'implication de la primo-infection à CMV a aussi été mise en évidence pour 5 à 10 % des cas de syndrome de Guillain-Barré (Ang, Jacob et al. 2000). Le nouveau-né peut fréquemment être infecté au cours de l'accouchement au contact de sécrétions maternelles, puis plus tard par le lait maternel, ou par contact avec des sujets excréteurs (Marshall, Rabalais et al. 1993). A l'instar de l'infection du jeune enfant, l'infection du nouveau-né ne s'accompagne généralement pas de manifestations cliniques. Dans quelques cas cependant, notamment en cas de prématurité, l'infection peut être symptomatique et provoquer une pneumopathie entre la 4^{ème} et la 12^{ème} semaine (Kumar, Nankervis et al. 1973).

Manifestations les plus communes	Manifestations à fréquence moyenne	Manifestations plus rares
Infections asymptomatiques	Pharyngites et tonsillopharyngites	Hépatites
Syndrome mononucléosique	Splénomégalie	Syndrome de Guillain-Barré
Fièvres prolongées	Adénopathies cervicales	Encéphalites
Malaises	Anémie	Myocardites
Céphalées	Présence d'agglutinines froides	Méningites aseptiques
Myalgies	Élévation du facteur rhumatoïde	Pneumonies
Sueurs profuses	Hypergammaglobulémie polyclonale	Athérosclérose
Diarrhée	Arthralgies et arthrites	Sténoses
Amaigrissement	Colites ulcérales	
Toux sèche et douleurs pharyngées	(Test de Coombs direct positif)	
Élévation du taux de transaminases		
Hyperlymphocytose		

Tableau 2 : Distribution des manifestations cliniques et biologiques au cours des infections aiguës à cytomégalovirus chez les sujets immunocompétents.

La primo-infection à CMV durant la grossesse reste à l'origine des manifestations cliniques les plus sévères qui dépendent du statut sérologique de la mère (figure 6) (Bopanna, Fowler et al. 1999). La survenue de primo-infection congénitale à CMV est décrite dans 0,7 à 7,1 % des grossesses. Elle conduit à une infection materno-fœtale dans 40 % des cas (Stagno, Pass et al. 1986). Les anticorps maternels anti-CMV ont un rôle protecteur contre la transmission intra-utérine mais sont sans effet sur l'infection constituée ; aussi, le risque pour le fœtus est-il maximum si la primo-infection survient dans les trois premiers mois de la grossesse (Bopanna, Fowler et al. 1999; Gaytant, Steegers et al. 2002). La maladie congénitale associée au cytomégalo virus est difficile à identifier et le diagnostic n'est pas toujours posé. Cependant, une étude a montré que des nouveau-nés touchés par des infections asymptomatiques développaient des séquelles auditives ou des atteintes neurologiques dans 5 à 15 % des cas (figure 6). La majorité (85 à 95 %) des enfants développant une infection asymptomatique *in utero* présente une évolution normale. Cette même étude révèle que 20 à 30 % des nouveau-nés développent des atteintes irréversibles du système nerveux central dont les formes cliniques sont : microcéphalies, encéphalites, surdité (isolée dans 10 % des cas), disfonctionnements du système locomoteur, retard psychomoteur, et rarement myopathies ou choroïdorétinites (Bopanna, Pass et al. 1992; Demmler 1996; Bopanna, Fowler et al. 1999).

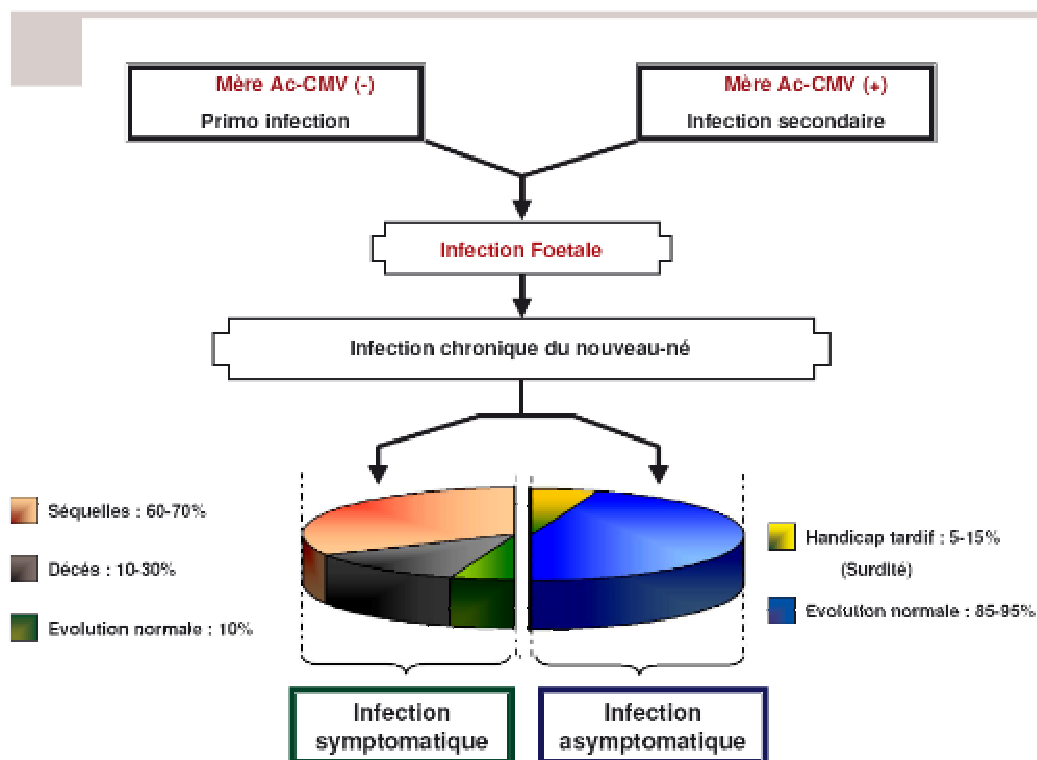


Figure 6 : Transmission materno-fœtale du cytomégalo virus

Pour revue Bopanna, Pass et al. 1992; Alain and Mazeron 2001; Gaytant, Steegers et al. 2002; Gandhi and Khanna 2004

b) Manifestations cliniques chez le sujet immunodéprimé

La réponse immunitaire induite par la primo-infection à CMV aboutit à une immunisation du sujet qui limite les conséquences cliniques des infections secondaires dues à une souche exogène ou endogène. Les conséquences d'une infection à CMV au cours d'une immunosuppression prolongée, liée à une co-infection par le VIH ou à un traitement immunosuppresseur, dans le cadre de transplantation d'organe solide ou de moelle osseuse, peut conduire, à terme, à une réactivation du CMV latent ou à l'infection par une souche exogène.

(1) Infection à CMV au cours du SIDA

La majorité des patients infectés par le VIH est co-infectée par le cytomégalo virus. La mise en place, depuis 1996, de la trithérapie antirétrovirale a permis de diminuer de près de 80 % l'incidence de la maladie à CMV (Pallela, Delaney et al. 1998; Salmon, Mazon et al. 2000).

L'infection à CMV chez les sujets infectés par le VIH s'accompagne de manifestations cliniques variées dépendant de l'organe atteint. Ces dernières incluent des atteintes neurologiques, digestives, hépatobiliaires, pulmonaires, et des atteintes du système circulatoire (Alain and Mazon 2001). La manifestation clinique la plus fréquente est la rétinite à CMV. Ces manifestations cliniques surviennent chez les patients dont le taux de cellules CD4 est inférieur à 100/mm³. Avant l'utilisation des antirétroviraux dans les pays développés, ou encore actuellement dans les pays du « Tiers Monde », 25 % des sujets VIH+/CMV+ développaient des rétinites (Jacobson 1997). L'application des trithérapies permet dorénavant de restaurer le taux de cellules T CD4+, et par conséquent la réponse immunitaire, en particulier au niveau oculaire, limitant l'incidence de ce type d'affections. Cette réponse se traduit par une inflammation du segment postérieur de l'œil qui peut être résorbée rapidement par un simple traitement à base de dérivés stéroïdes (Jacobson 1997; Karavellas, Plummer *et al.* 1999).

Les atteintes neurologiques surviennent généralement lors des phases tardives de la maladie et peuvent toucher le système nerveux central (encéphalites, syndrome de Guillain-Barré, méningoencéphalites ou encéphalites micronodulaires), ou du système nerveux périphérique (polyradiculonévrites lombosacrées, mononévrites, neuropathies périphériques douloureuses, et myélites) (Winters, Kwok *et al.* 1989; McCutchan 1995; Grassi, Clerici *et al.* 1998).

Le tableau clinique des atteintes digestives est dominé par des atteintes coliques asymptomatiques ou non : hémorragies digestives, diarrhée, voire colites pseudomembraneuses. Toutefois, les manifestations cliniques peuvent toucher tout le système digestif de la bouche à l'anus : lésions orificielles (ulcérations de la bouche, de l'anus ou du rectum), atteintes oesophagiennes (dysphagies, odynophagies, associées à des douleurs thoraciques et à un amaigrissement rapide), atteintes gastroduodénales (hémorragies ou ulcérations associées à des douleurs épigastriques ou à une gastroparésie), lésions intestinales (ulcères de l'iléon et du grêle proximal, appendices suppurés, perforés ou hémorragiques) (René, Marche *et al.* 1988; Nico, Cymbalista *et al.* 2000).

Au cours du SIDA, des atteintes hépatobiliaires sont fréquemment associées aux rétinites ou aux lésions digestives (20 à 25 % des cas). Il peut s'agir d'hépatites cytolytiques, de cholécystites acalculieuses, ou de cholangites sclérosantes (Meyohas 1999; Alain and Mazon 2001).

Des atteintes pulmonaires peuvent aussi survenir chez les sujets VIH+ co-infectés par le CMV, mais l'incidence de ce type de manifestations a nettement diminué du fait de l'utilisation des traitements antirétroviraux. Le tableau clinique est dominé par des pneumopathies interstitielles fébriles, des toux et dyspnées, voire un syndrome respiratoire aiguë souvent causé par l'association de l'infection à CMV et de surinfections à *Pneumocystis carinii*, *Toxoplasma gondii*, ou *Haemophilus influenzae*... (Blot, Mayaud *et al.* 1995).

Enfin, les infections à cytomégalo virus au cours SIDA peuvent aussi être responsables de divers troubles du système circulatoire telles des microangiopathies thrombotiques (thrombopénie périphérique décrite avec association à une atteinte rénale ou neurologique, à une hémiplégie de convulsion ou à un coma), et des hémorragies intra-alvéolaires avec hémolyse intravasculaire (Maslo, Peraldi *et al.* 1997).

(2) Infection à CMV après greffe d'organe solide, de moelle osseuse ou de cellules souches hématopoïétiques

Les transplantations instaurent chez le receveur un état connu pour favoriser les réactivations virales : stress post-chirurgical, état septique et élévation du taux de catécholamines. Ces interventions nécessitent en outre l'application d'un traitement immunosuppresseur destiné à limiter le risque de rejet du greffon. L'accumulation de ces facteurs favorise ainsi fortement la réplication du CMV à partir d'infections d'origine exogène, d'une contamination par le greffon ou d'une réactivation d'une souche latente.

Ainsi, l'infection à cytomégalovirus constitue-t-elle une cause majeure de morbidité et de mortalité chez les transplantés d'organes solides, de moelle osseuse ou de cellules souches hématopoïétiques (Alain and Mazon 2001). L'incidence des maladies à CMV chez les transplantés atteint 30 % mais varie en fonction du degré d'immunosuppression, de sa durée et de l'état du système immunitaire du receveur. L'infection à CMV atteint son maximum entre le 1^{er} et le 4^{ème} mois post-greffe (Rubin 1990; Alain and Mazon 2001). Les manifestations cliniques varient aussi en fonction de l'organe transplanté. L'incidence des infections à CMV avoisine les 25 % après transplantation de foie, de cœur ou de rein. Elle atteint les 50 % après transplantation de pancréas ou de double transplantation rein/pancréas et dépasse les 50 % après double transplantation foie/cœur (Speich and Van Der 2001; Rowshani, Bemelman *et al.* 2005).

Le statut sérologique du receveur avant la greffe détermine l'incidence et la sévérité des maladies. Ainsi, un receveur séronégatif recevant un organe CMV positif (D+/R-) pourra développer une primo-infection (Tableau 3). Il en est de même dans le cas d'une transplantation d'un organe CMV- chez un receveur séronégatif (D-/R-) subissant une contamination post-greffe (indépendante de la transplantation elle-même). Par ailleurs, la transplantation d'un greffon CMV+ chez un receveur séronégatif ou séropositif (D+/R- ou D+/R+), pourra être associée à une réactivation d'une souche endogène ou à une infection par une souche exogène (Tableau 3).

Les manifestations cliniques varient en fonction de l'organe transplanté et de l'importance de l'immunosuppression. Le tableau clinique comprend alors : fièvre, myalgie, leucopénie, thrombocytopénie, élévation du taux de transaminases, pneumonie, oesophagite et colite. Chez les receveurs de moelle, la maladie à CMV la plus fréquente est la pneumopathie interstitielle qui survient chez près de 20 % des sujets avec un taux de mortalité qui atteint 90 % en l'absence de traitement (Churchill, Zaia *et al.* 1987). La maladie à CMV peut aussi, dans certains cas, affecter le greffon lui-même et participer à son rejet. Il a été montré que l'incidence des réactions du greffon contre l'hôte atteint 50 % chez les receveurs virémiques de moelle ou de cellules souches hématopoïétiques contre 13 % chez les sujets non virémiques (Bronsther, Makowka *et al.* 1988; Rowshani, Bemelman *et al.* 2005).

Statut Receveur/Donneur	Type d'infection	Rein		Foie	
		Infection	Maladie	Infection	Maladie
D+/R+	Réactivation ou réinfection	51%	19%	66%	23%
D+/R-	Primo-infection	67%	50%	77%	61%
D-/R+	Réactivation	59%	12%	49%	10%
D-/R-	Primo-infection (indépendante du greffon)	51%	19%	10%	10%

Tableau 3 : Taux d'infections et de maladies à CMV chez des transplantés de foie ou de rein. (Metselaar and Weinarn 1989; Wiesner, Marin et al. 1993; Pass 2004; Rowshani, Bemelman et al. 2005)

Les symptômes principaux de l'infection à CMV sont la conséquence directe de la lyse des cellules induite par la réplication même du virus. Cependant, il est admis que l'infection à CMV est aussi à l'origine d'effets secondaires impliquant la production de cytokines et de chémokines au cours de la réponse immunitaire déclenchée par l'infection à CMV (Nordoy, Muller *et al.* 2000; Durandy 2001). Il a ainsi été démontré que l'infection à CMV est associée à une augmentation de la sensibilité aux agents infectieux opportunistes (Fishman and Rubin 1998) et accroît, après transplantation, de 7 à 10 fois le risque de développer des maladies lymphoprolifératives associées à l'EBV (Walker, Marshall *et al.* 1995).

4. Diagnostic de l'infection à CMV

Pour revue Alain et Mazon 2001

a) Généralités

Le diagnostic de l'infection à cytomégalovirus peut être effectué à l'aide de différentes techniques et dans différents cadres (Tableau 4). Il a pour but d'évaluer au mieux le risque d'apparition de complications liées aux maladies à CMV. La recherche du virus à l'état latent est recommandée chez les donneurs et receveurs d'organes solides, de cellules souches hématopoïétiques, ou de sang, pour limiter ou estimer le risque de primo-infection. Le diagnostic peut être pratiqué afin de détecter la survenue de maladies à CMV si des manifestations correspondant au tableau clinique d'une infection à cytomégalovirus sont observées. Dans le cadre des infections materno-fœtales, ou des infections du nouveau-né ou

du jeune enfant, le diagnostic est requis pour distinguer primo-infections et infections secondaires et donc pour évaluer les risques de complications. Enfin le diagnostic est préconisé dans le cadre de la surveillance virologique des sujets immunodéprimés, pour prévenir la survenue de complications graves.

La recherche du statut immunitaire vis-à-vis du CMV est recommandée chez l'immunocompétent, chez la femme enceinte, et chez le donneur et le receveur, dans le cadre de transplantations d'organe solide ou de moelle. La recherche de l'infection active, quant à elle, permet de mettre en évidence la dissémination sanguine du virus. Elle est ainsi particulièrement utile à la surveillance de l'infection à CMV chez les patients immunodéprimés. Enfin, elle peut être utilisée chez l'immunocompétent pour rechercher une primo-infection, et chez la femme enceinte pour évaluer le risque de contamination sanguine du fœtus au moment de l'amniocentèse ou de l'accouchement.

b) Les marqueurs diagnostiques de l'infection à CMV

L'examen cytologique peut être effectué à partir de coupes de biopsies, de frottis, ou après cyto centrifugation ou étalement sur lame de liquides biologiques tels les lavages broncho-alvéolaires (LBA), ou le liquide amniotique (Alain and Mazon 2001). Il permet de mettre en évidence les cellules infectées à morphologie caractéristique dite en « œil de hibou » (figure 5). Il s'agit de cellules volumineuses, à inclusions intracellulaires séparées de la membrane nucléaire par un halo clair.

La culture cellulaire classique est la technique de référence pour le diagnostic des infections à cytomégalovirus. Elle consiste en l'inoculation des prélèvements sur des fibroblastes embryonnaires humains (cellules MRC-5). L'infection des cellules MRC-5 se traduit par l'apparition d'amas de cellules infectées caractérisées par leur aspect volumineux et réfringent : les foyers d'effet cytopathique (ECP).

Méthode	Marqueur	Délai / Rapidité	Sensibilité	Spécificité	
Culture					
Culture classique	Virémie	1 à 7 semaines	--	+	+++
Culture rapide		24 à 48 heures	+	++	+++
Détection des antigènes					
pp65	Antigénémie	5 à 6 heures	+++	++	+++
Autre		3 heures	+++	+/-	++
Détection de l'ADN viral					
PCR	ADNémie	24 à 48 heures	+++	+++	++
Hybridation		24 à 48 heures	+++	++	++
Détection de l'ARN viral					
RT-PCR	ARNémie	48 à 72 heures	-	++	++
NASBA		24 à 48 heures	+	++	+++

Tableau 4 : Méthodes de diagnostic direct des infections à CMV ; classification et caractéristiques.

La culture cellulaire rapide associe deux méthodes : culture et immunofluorescence ou culture et immunopéroxydase. La première étape consiste en l'inoculation de cellules MRC-5 à partir d'un prélèvement centrifugé suivi d'une incubation de 24 à 48 heures. La deuxième étape vise à mettre en évidence les cellules infectées par détection des antigènes très précoces du virus par immunofluorescence ou immunopéroxydase. Comme toutes les méthodes de diagnostic s'appuyant sur la culture cellulaire, cette technique souffre de l'absence de standardisation et d'une sensibilité inférieure à celle des techniques de détection de l'ADN viral (Mazeron and Alain 1999; Alain and Mazeron 2001).

L'antigénémie vise à rechercher les antigènes viraux intracellulaires par immunofluorescence ou immunopéroxydase. La cible de référence est la protéine du tégument pp65. Cette technique a l'avantage d'allier sensibilité, rapidité et facilité d'exécution mais nécessite de traiter rapidement l'échantillon après le prélèvement (Mazeron and Alain 1999; Alain and Mazeron 2001).

Le diagnostic de l'infection peut s'appuyer sur la recherche directe des acides nucléiques viraux (ADN ou ARN). La détection de l'ADN viral est pratiquée en ayant recours à différentes techniques de biologie moléculaire : hybridation à l'aide d'une sonde spécifique (Hybrid capture System CMVH DNA Assay®, Digene), amplification par réaction de polymérisation en chaîne (techniques maisons simplex ou multiplex ; CMV AMPLICOR®, Roche), technique de l'ADN branché (Bayer). La détection des ARN messagers viraux peut être effectuée par transcription inverse (RT-PCR) et selon la technique NASBA (*Nucleic Acid Sequenced Based Amplification*). Elle permet, suivant la cible détectée (gène très précoce ou

tardif), le diagnostic des infections actives (Nuclisens™ CMVH pp67 Assay ou Nuclisens™ CMVH IE Assay, Organon Teknika). La détection de l'ADN viral reste la technique la plus sensible pour le diagnostic de l'infection à CMV (Mazeron and Alain 1999; Alain and Mazeron 2001; Pass 2004).

La charge virale peut être déterminée par toutes les méthodes permettant de quantifier les virus circulants : antigénémie et quantification des ADN ou ARN viraux dans les leucocytes ou dans le sérum, par hybridation ou par PCR quantitative. Ces méthodes souffrent d'un manque de standardisation des protocoles eux-mêmes ou des méthodes d'expression des résultats. La quantification de la charge virale permet cependant d'évaluer la cinétique de l'expression virale chez un sujet et donc de mettre en place une politique de surveillance (post-greffe par exemple).

L'infection peut aussi être mise en évidence de façon indirecte par sérodiagnostic. Cette méthode consiste à rechercher les anticorps totaux anti-CMV, à l'aide de techniques d'agglutination, ou les immunoglobulines IgG anti-CMV, par des tests enzymatiques (test ELISA : *Enzyme-Linked Immunosorbent Assay*). Les immunoglobulines les plus fréquemment recherchées sont des IgG et IgM dirigées contre les phosphoprotéines du tégument pp150 et pp65. La présence d'anticorps anti-pp150 suffit à poser le diagnostic de l'infection à CMV. Des discordances dans les résultats peuvent être observées du fait de la complexité antigénique des protéines du tégument du CMV et du mode de préparation des antigènes utilisés dans le test (Mazeron and Alain 1999; Alain and Mazeron 2001; Pass 2004).

VI. Traitement et prévention des infections à CMVH

1. Molécules et stratégies antivirales (Tableau 5)

a) Inhibiteurs de la réplication de l'ADN viral

La gravité de l'infection à CMV chez les patients immunodéprimés a motivé le développement de molécules antivirales issues du screening d'inhibiteurs de l'ADN polymérase virale (figure 7). Trois molécules sont disponibles pour le traitement des infections à CMV : le ganciclovir, un analogue nucléosidique, le cidofovir, un analogue

nucléosidique monophosphaté et le foscarnet ou phosphonoformate, un analogue de pyrophosphate inorganique.

L'utilisation de ces molécules ne permet pas d'éradiquer le virus à l'état latent mais d'empêcher sa réplication et des traitements prolongés, parfois à posologie réduite, peuvent être nécessaires tant que l'immunodépression persiste.

(1) Ganciclovir (GCV) et valganciclovir (Val-GCV)

Le ganciclovir ou 9-(1,3-dihydroxy-2-propoxyméthyl)-guanine, un analogue acyclique de la désoxyguanosine (figure 8) est utilisé depuis 1983. Pour être actif, le GCV doit être sous sa forme triphosphate. La primo-phosphorylation du ganciclovir est réalisée par une sérine/thréonine kinase d'origine virale, la phosphoprotéine pUL97 (Littler, Stuart *et al.* 1992). Le GCV monophosphate (GCV-P) est alors pris en charge par les kinases cellulaires, la guanylate kinase et la phosphoglycérate kinase (Matthews and Boehme 1988), pour être di- puis tri-phosphorylés en sa forme triphosphate active (GCV-PPP) (figure 7).

L'effet virostatique du GCV-PPP résulte de l'inhibition de l'ADN polymérase virale à deux niveaux : inhibition de l'activité polymérase par compétition avec les nucléosides, substrats naturels de l'enzyme, et inhibition de l'élongation de la molécule d'ADN en cours de synthèse par blocage du site catalytique (Matthews and Boehme 1988). Toutefois, le GCV n'est pas un terminateur absolu et une activité résiduelle de l'enzyme persiste, se traduisant par la présence de fragments subgénomiques dans les cellules infectées (Hamzeh and Lietman 1991). Le ganciclovir agit sur un spectre large d'herpèsvirus, mais son action, *in vitro*, sur le VZV et l'EBV est faible (Naesen and De Clercq 2001).

Le ganciclovir a une demi-vie intracellulaire de 12 heures. Il peut être administré par voie orale, intraveineuse, ou intravitréenne avec respectivement des demi-vies plasmatiques de 7,7 heures, 2,5 heures, et 13,3 heures (Cheng, Grill *et al.* 1983; Field, Davies *et al.* 1983). La biodisponibilité du ganciclovir administré par voie orale n'excède pas 10 % si bien qu'il est essentiellement administré par voie intraveineuse. Cette lacune du GCV a été compensée par le développement récent de sa prodrogue, le valganciclovir (val-GCV) dont la biodisponibilité atteint 60 % après administration orale. Les concentrations maximales plasmatiques (C_{max}) du GCV et du val-GCV sont respectivement de 2,9 µg.mL⁻¹ et de 5,6 µg.mL⁻¹ pour une administration orale de 5 mg.Kg⁻¹ de GVC. Les implants intravitréens

permettent de traiter les rétinites chez les sujets atteints du SIDA. Le GCV et le val-GCV sont éliminés par voie rénale.

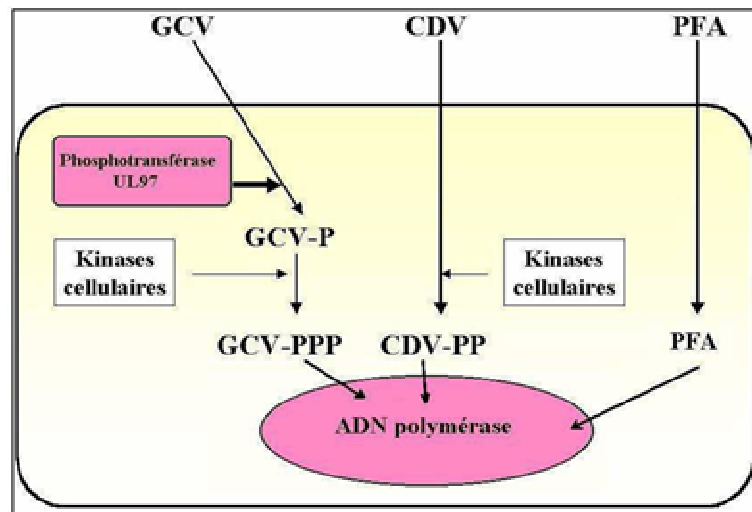


Figure 7 : Mécanisme d'action des inhibiteurs de l'ADN polymérase virale

GCV : ganciclovir ; GCV-P : ganciclovir monophosphate ; GCV-PP : ganciclovir triphosphate ; CDV : cidofovir ; CDV-PP : cidofovir diphosphate ; PFA : phosphonoformate.

De nombreux effets indésirables sont associés à l'administration du GCV ou de sa prodrogue. Le GCV et le val-GCV présentent principalement une toxicité hématologique. Après trois mois de traitement par voie intraveineuse, 40 % des sujets présentent des leuconéutropénies sévères et 15 % des thrombocytopénies. Ces molécules peuvent aussi provoquer des troubles neurologiques tels : ataxie, coma, et crises compulsives. Enfin des troubles rénaux de type hématurie et hypercréatinémie ont aussi été décrits (Crumpeker 1996; Gérard and Salmon 1999; Gandhi and Khanna 2004).

(2) Cidofovir (CDV)

Le cidofovir, ou 1-(3-hydroxy-2-phosphonylméthoxypropyl)-cytosine est un analogue de la désoxycytidine monophosphate (figure 8) (Lea and Bryson 1996). Ainsi, contrairement au GCV, le CDV doit seulement être di-phosphorylé (CDV-PP) pour acquérir son activité d'inhibition compétitive de l'ADN polymérase virale pUL54. Sa phosphorylation n'implique que des kinases cellulaires et ne nécessite pas l'intervention de la phosphoprotéine pUL97 (Cihlar and Chen 1996; Mazon 1997). Le CDV-PP seul ne suffit pas à constituer un terminateur absolu de l'élongation de l'ADN et, comme pour le GCV, une activité résiduelle

de l'ADN polymérase persiste. A l'inverse, il a été montré que la fixation de deux molécules de CDV au niveau du site catalytique polymérasique bloque définitivement l'activité de pUL54 (Xiong, Smith *et al.* 1996; Xiong, Smith *et al.* 1997). Le CDV a un spectre d'action large : il inhibe l'ADN polymérase des herpèsvirus, des adénovirus, des poxvirus, du virus JC, ainsi que les polymérases cellulaires mais à un taux 600 à 800 fois plus faible. Afin d'améliorer la biodisponibilité de cette molécule, deux prodrogues sont en cours de développement : l'hexadecyloxypropyl-CDV (HDP-CDV) et l'octadecyloxyethyl-CDV (ODE-CDV).

Le cidofovir est actuellement administré exclusivement par voie intraveineuse. Il a une demi-vie longue qui varie de 17 à 65 jours suivant les études et les sujets. Ce qui permet d'en espacer l'administration.

Le cidofovir a le double avantage d'avoir peu d'interactions médicamenteuses et de ne pas interagir avec le ganciclovir. Sa Cmax est de $20 \mu\text{g.mL}^{-1}$ pour une administration orale de 5 mg.Kg^{-1} .

De nombreux effets indésirables sont associés à l'administration du CDV. L'administration de cette molécule est principalement associée à des troubles rénaux telles protéinurie et hypercréatinémie et à des troubles digestifs tels nausées et vomissements. Cependant, d'autres effets ont été décrits tels : fièvre, asthénie, alopecies, uvéites antérieures, rash cutané, diminution de la pression intraoculaire, ou neuropathie périphérique (Gérard and Salmon 1999; Gandhi and Khanna 2004).

(3) Foscarnet ou phosphonoformate (PFA)

Le foscarnet ou phosphonoformate, est un analogue de pyrophosphate inorganique (figure 8). Il s'agit d'un inhibiteur compétitif sélectif et réversible de l'ADN polymérase virale. Après sa fixation au niveau du site catalytique de l'ADN polymérase virale, le PFA empêche le clivage des désoxyribonucléosides triphosphates en désoxyribonucléosides diphosphates et en pyrophosphates inorganiques (Hitchcock, Jaffe *et al.* 1996; Reusser 1996). A l'instar du CDV, le PFA n'interagit pas avec le ganciclovir et a un spectre d'action large puisqu'il est reconnu par l'ADN polymérase virale de tous les herpèsvirus. De plus, le PFA n'a que peu d'interactions médicamenteuses et n'interfère pas avec le métabolisme cellulaire à concentration thérapeutique. Sa concentration maximale plasmatique de $220 \text{ à } 240 \mu\text{mol.L}^{-1}$

limite son mode d'administration à la voie intraveineuse. Sa demi-vie plasmatique varie entre 2,4 et 6 heures (Chrisp and Clissold 1991).

Quelques effets indésirables sont associés à l'administration de foscarnet. Il s'agit le plus souvent de troubles rénaux, telles hypercréatinémie et insuffisance rénale, ou de troubles digestifs tels nausées et vomissements. D'autres troubles peuvent aussi apparaître telles une hypocalcémie, une anémie, des ulcérations péniennes ou des crises compulsives (Gérard and Salmon 1999; Gandhi and Khanna 2004).

(4) Aciclovir (ACV) et valaciclovir (Val-ACV)

L'aciclovir, ou 9-(3-hydroxy-2-propoxyméthyl)-guanine, est un analogue acyclique de la désoxyguanosine comme le GCV dont il est très proche structurellement. Le mode d'action de l'ACV vis-à-vis du cytomégalovirus est ainsi proche de celui du GCV mais son efficacité est moindre alors qu'il est très efficace pour le traitement des infections à herpès simplex et à VZV. L'efficacité de l'ACV ou du Val-ACV en traitement prophylactique des infections à CMV chez les sujets immunodéprimés dans le cadre de transplantations ou chez les patients atteints du SIDA a été démontrée. L'aciclovir et surtout sa prodrogue le val-aciclovir (val-ACV) sont administrés par voie orale. Leur biodisponibilité est respectivement de 15 % et 54 % (Naesen and De Clercq 2001). Leur demi-vie plasmatique est de 2 à 3 heures et leur demi-vie intracellulaire se limite à 1 ou 2 heures.

L'ACV est un inhibiteur compétitif, spécifique et irréversible de l'ADN polymérase virale. Il bloque définitivement le site catalytique des polymérases auxquelles il se fixe, empêchant l'élongation de l'ADN viral. A l'instar du GCV, l'ACV n'est actif que sous sa forme triphosphate. Il nécessite ainsi d'être monophosphorylé par une kinase virale puis d'être bi- puis tri-phosphorylé par des kinases cellulaires. L'activité de l'ACV est donc dépendante de la phosphotransférase pUL97.

Quelques effets indésirables peuvent être associés à l'administration d'aciclovir tels une néphropathie réversible et des troubles digestifs ou neurologiques.

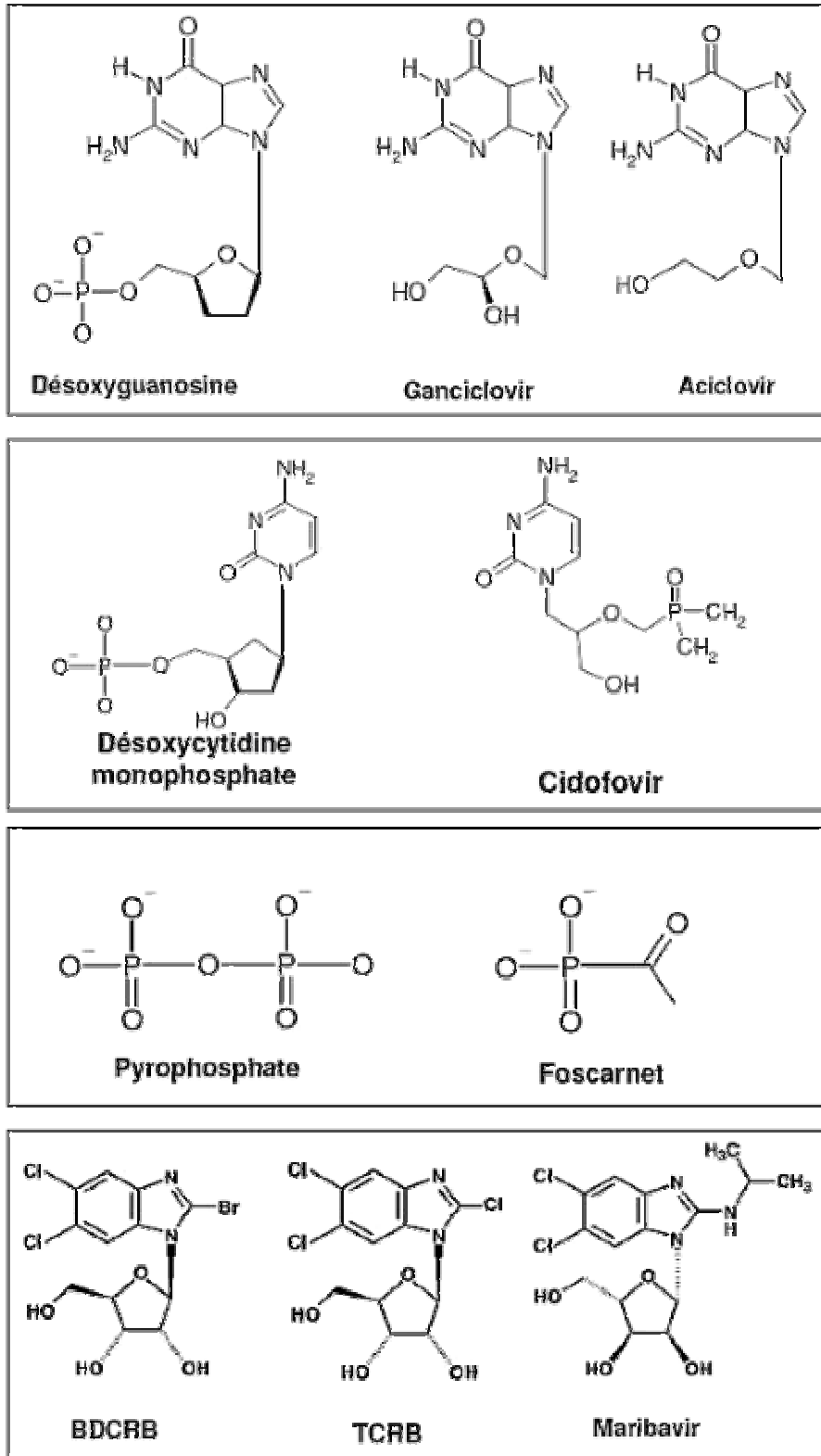


Figure 8 : Structure chimique des principales molécules antivirales ;

Formules chimiques de la désoxyguanosine et de ses homologues, le ganciclovir et l'aciclovir (ACV) ; de la désoxyguanosine monophosphate et de son analogue, le cidofovir ; du pyrophosphate inorganique et de son analogue, le foscarnet ; et des dérivés benzimidazolés D-ribonucléosides (BDCRB et TCRB) et L-ribonucléosides (maribavir).

b) Autres stratégies de traitement des infections à CMV

(1) Formivirsén

Le formivirsén est un oligonucléotide antisens qui inhibe la traduction des gènes très précoces du CMV. Les oligonucléotides se lient par complémentarité aux ARN messagers des transcrits très précoces. Ils empêchent ainsi leur traduction et donc la production des transactivateurs impliqués dans le contrôle des gènes viraux et cellulaires. Le formivirsén inhibe ainsi l'entrée du virus dans le cycle de réplication. Compte tenu de sa structure inerte, il n'a aucune interaction médicamenteuse et n'interagit pas avec les autres traitements. Son mécanisme d'action est indépendant de l'activité de la phosphotransférase pUL97, et ne vise pas la synthèse d'ADN, aussi reste-t-il actif sur les souches résistantes au GCV, CDV et PFA. Le formivirsén est administré exclusivement sous forme d'implants intravitréens du fait de sa faible biodisponibilité, dans le cadre du traitement des rétinites récemment diagnostiquées ou persistantes chez les sujets atteints du SIDA (Vitraven Study group 2002).

(2) Immunoglobulines anti-CMV

Les résultats d'une étude randomisée réalisée sur des receveurs de cellules souches hématopoïétiques et sur des transplantés rénaux, traités en prophylaxie par immunoglobulines anti-CMV, montrent la diminution du risque de développer des maladies à CMV (Snydman, Werner *et al.* 1987). Au contraire, l'efficacité de l'association d'immunoglobulines anti-CMV au ganciclovir pour le traitement des pneumopathies à CMV est controversée, d'autant qu'aucune étude randomisée n'a été publiée. Les études disponibles montrent des résultats divergents quant à l'efficacité de ce type de traitement (Reed, Bowden *et al.* 1988; Boeckh 1999; Machado, Dulley *et al.* 2000).

c) Molécules antivirales en développement

L'émergence de souches résistantes, la cytotoxicité des inhibiteurs de l'ADN polymérase virale et leurs effets indésirables ont conduit les scientifiques à rechercher une cible antivirale autre que la réplication de l'ADN viral. Dans le milieu des années 1990, le développement de nouvelles molécules antivirales, assisté par informatique, a permis la découverte d'une nouvelle classe d'analogues nucléosidiques ayant une activité inhibitrice de la multiplication

du CMV : les dérivés benzimidazolés ribonucléosides. Très rapidement, il a été démontré que l'activité antivirale de ces molécules ne portait pas sur l'inhibition de la réplication de l'ADN viral mais sur sa maturation et plus précisément sur son encapsidation. De nombreuses équipes se sont alors intéressées à cette classe de molécules pour différentes raisons. D'une part, elles ne ciblent pas l'ADN polymérase virale, et peuvent donc rester actives sur les souches résistantes aux GCV, CDV et/ou PFA. D'autre part, elles ciblent un mécanisme qui ne connaît pas d'équivalent dans le métabolisme cellulaire, ce qui limite fortement le risque d'effets indésirables et de cytotoxicité. Enfin, les premières études ont montré que ces molécules avaient une forte activité inhibitrice de la réplication virale. Suivant leur chiralité cette classe de molécule est divisée en deux familles, les dérivés benzimidazolés D-ribonucléosides (dérivés dextrogyres) et les dérivés benzimidazolés L-ribonucléosides (dérivés lévogyres). Il a été montré que la chiralité des molécules jouait un rôle dans leur mécanisme d'action puisque les dérivés dextrogyres ciblent le complexe d'encapsidation de l'ADN viral, tandis que les dérivés lévogyres ciblent le transit extracellulaire des capsides (*nuclear egress*) (Koszalka, Johnson *et al.* 2002; Komazin, Ptak *et al.* 2003; Krosky, Back *et al.* 2003).

(1) Benzimidazoles D-ribonucléosides : BDCRB, TCRB, et dérivés

Quelques benzimidazoles D-ribonucléosides : le BDCRB (2-bromo-5,6-dichloro-1-(β -D-ribofuranosyl)benzimidazole), son 2-chloro analogue le TCRB (2,5,6-trichloro-1-(β -D-ribofuranosyl)benzimidazole) (Townsend, Devivar *et al.* 1995), le Cl₄RB (4,5,6-tetrachloro-1-(2,3,5-tri-O-acetyl- β -D-ribofuranosyl) benzimidazole) (Underwood, Harvey *et al.* 1998) et le CDMRB (2-chloro-5,6-dimethyl-(1- β -D-ribofuranosyl) benzimidazole) (Dittmer, Drach *et al.* 2005) sont des inhibiteurs des protéines impliquées dans le complexe d'encapsidation. Même s'il est communément admis que ces agents, et plus particulièrement le BDCRB et le TCRB, qui sont les plus étudiés, ciblent pUL56, pUL89 et pUL104, leur mode d'action reste mal connu. Deux mécanismes pourraient être à l'origine de l'inhibition de la réplication virale par les dérivés benzimidazolés de type D-ribonucléoside : un blocage, par la molécule, de l'interaction des protéines d'encapsidation entre elles et avec l'ADN, ou un blocage de l'activité nucléasique de certaines de ces protéines. Les essais portant sur ces molécules ont été arrêtés du fait de leur faible biodisponibilité (Williams, Hartline *et al.* 2003). Les premières études ont révélé que les benzimidazoles D-ribonucléosides inhibaient très efficacement la réplication du CMV ; aussi, différentes équipes cherchent-elles aujourd'hui à

développer des dérivés plus stables du BDCRB et du TCRB (Townsend, Devivar *et al.* 1995; Underwood, Harvey *et al.* 1998; Williams, Hartline *et al.* 2003; Kern, Hartline *et al.* 2004; Nixon and McVoy 2004). Les études actuelles se tournent vers des dérivés quinolines C-nucléosides (Chen, Drach *et al.* 2003), ou des dérivés imidazoles nucléosides polyhalogénés (Chien, Saluja *et al.* 2004).

Les dérivés benzimidazolés ne nécessitent pas, pour être actifs, de phosphorylation par la phosphotransférase pUL97 et ont un mécanisme d'action différent des analogues nucléosidiques classiques. Ces molécules sont ainsi efficaces sur les souches de cytomégalo virus multi-résistantes aux drogues classiques et pourraient constituer une alternative intéressante en thérapeutique (Underwood, Harvey *et al.* 1999; Krosky, Borysko *et al.* 2002). Enfin, compte tenu de la forte conservation du mécanisme d'encapsidation chez les herpesvirus, cette classe de molécules pourrait être utilisée dans des stratégies thérapeutiques à spectre large (Williams, Hartline *et al.* 2003).

(2) Benzimidazole L-ribonucléosidique : maribavir (MBV)

Le maribavir, ou 2-isopropylamino-5,6-dichloro-1-(β -L-ribofuranosyl)benzimidazole, est un dérivé lévogyre du BDCRB obtenu par substitution du brome en position 2 par un groupement isopropylamine (Chulay, Biron *et al.* 1999; Biron, Harvey *et al.* 2002; Evers, Komazin *et al.* 2004). Le MBV, initialement développé par les laboratoires GlaxoSmithKline (1263W94), puis actuellement par le laboratoire Viropharma, semble à ce jour constituer une alternative de choix pour le traitement des infections à CMV. Les premiers tests *in vitro* ont montré par mesure de la concentration inhibitrice à 50 % (CI50) qu'il s'agissait d'un puissant inhibiteur de la réplication du CMV. Ces études pré-cliniques ont, en effet, révélé que le maribavir avait une efficacité 7 à 10 fois supérieure à celle du GCV pour l'inhibition de la réplication de la souche AD169 (Koszalka, Johnson *et al.* 2002; Lalezari, Aberg *et al.* 2002). Ces résultats ont été confirmés sur des isolats cliniques (Biron, Harvey *et al.* 2002). Le MBV ne cible pas la synthèse d'ADN et reste actif sur les souches résistantes au GCV, CDV et PFA comme l'a montré une étude réalisée en 1999 par l'équipe de Biron *et al.* à l'origine du développement du MBV (Chulay, Biron *et al.* 1999).

Le maribavir est un inhibiteur sélectif de la phosphotransférase pUL97 du CMVH et de la phosphotransférase BGLF4 du virus d'Epstein-Barr impliquant un mécanisme encore obscur (Gershburg, Hong *et al.* 2004). La glycoprotéine gpUL27 semble intervenir dans ce mécanisme, puisque des sites de résistance au MBV ont été décrits non seulement au sein de

UL97 mais aussi au sein de *UL27* (Komazin, Ptak *et al.* 2003; Chou, Marousek *et al.* 2004). Le maribavir cible l'étape de "*nuclear egress*", c'est-à-dire la translocation extranucléaire des capsides après l'étape d'encapsidation de l'ADN viral (Krosky, Back *et al.* 2003).

Les premiers tests de toxicité montrent que, pour des doses comprises entre 10 et 300 mg.Kg⁻¹, le MBV n'a pas d'effet indésirable significatif. Du point de vue pharmacologique, ces mêmes tests ont montré que le maribavir avait une bonne biodisponibilité après administration par voie orale (Koszalka, Johnson *et al.* 2002).

2. Traitements des infections à CMV

Pour revue Gérard and Salmon 2002; Legendre 2002; Milpied 2002

a) Traitement curatif

Le traitement antiviral spécifique dépend des manifestations cliniques. Il est réservé aux infections graves chez les sujets immunodéprimés et, exceptionnellement, chez les sujets immunocompétents.

Le ganciclovir est utilisé en traitement d'attaque des rétinites, des atteintes digestives, ou des atteintes coliques, chez le patient infecté par le VIH, ou en traitement curatif après greffe d'organe, à la dose de 5 mg par kg 2 fois par jour pendant minimum 3 semaines et jusqu'à cicatrisation des lésions oculaires (5 mg/Kg/12h/14-21j). Le taux de réponse clinique favorable est de 85 % pour le traitement des rétinites, 75 à 95 % pour les atteintes coliques et 70 à 85 % pour les atteintes digestives. Les rétinites peuvent aussi être traitées par des injections locales de ganciclovir à la dose de 400 µg deux fois par semaine en traitement d'attaque et 400 µg par semaine en traitement d'entretien, par injections intravitréennes, ou par l'utilisation d'implants intravitréens. Ce traitement permet d'obtenir une cicatrisation après 3 semaines de traitement chez près de 80 % des patients. Les immunoglobulines peuvent être utilisées en complément du traitement par ganciclovir par voie intraveineuse pour le traitement des pneumonies à CMV chez les transplantés de moelle osseuse (GCV seul, 5 mg/Kg/12h/14-21j, puis GCV+Immunoglobulines, 5 mg/Kg/24h/14j). Le taux de réponse clinique du traitement par association de GCV et d'immunoglobulines n'atteint que 50 % après 6 mois.

Suivant le type de maladie à CMV touchant le sujet et son niveau de reconstruction immunitaire, un traitement d'entretien peut être nécessaire pour éviter le risque de rechute dans un délai de 20 à 30 jours après le traitement d'attaque. Pour ce traitement d'entretien, le ganciclovir peut être administré par voie intraveineuse (5 mg/Kg/24h/7j ou 6 mg.Kg/24h/5j), par voie orale à raison de 3 g par jour en 3 prises, ou par implants intravitréens.

Chez les patients infectés par le VIH, le valganciclovir (900 mg/12h/21j) est utilisé en traitement d'attaque des rétinites à CMV nouvellement diagnostiquées et s'est révélé aussi efficace que le traitement par ganciclovir par voie intraveineuse. Le taux de réponse clinique favorable à 4 semaines est de 77 %. Le traitement d'entretien peut aussi être effectué par administration de valganciclovir jusqu'à reconstitution immunitaire (900 mg/24h) (Mazeron 1997; Alain and Mazeron 2001).

Le cidofovir peut être utilisé en traitement d'attaque des rétinites par voie intraveineuse à la dose de 5 mg/Kg/24h/15j puis 5 mg/Kg tous les 15 jours en traitement d'entretien, ou par injections intravitréennes à la dose de 20 µg par injection. Ce traitement est toutefois peu utilisé du fait de sa faible tolérance locale pouvant déboucher sur des complications oculaires.

En cas d'échec du traitement par ganciclovir ou d'effets indésirables, le foscarnet peut être utilisé pour le traitement des rétinites par voie intraveineuse, à la dose de 90 à 100 mg/Kg/12h/14-21j ou par injections intravitréennes en raison de 1,2 à 2,4 mg par injection. Le taux de réponse clinique favorable pour ces traitements est respectivement de l'ordre de 90 % et de 62 %. Le foscarnet peut aussi être utilisé en association avec le ganciclovir, à des doses de 100 mg/Kg/24h pour le PFA, et 10 mg/Kg/24h, pour le GCV. Le foscarnet peut être administré en cas d'échecs successifs des traitements par GCV puis par PFA, à des doses de 5 mg/Kg/24h/14j.

Enfin, l'administration de formivirsen peut aussi être préconisée dans le cadre du traitement des rétinites récemment diagnostiquées ou persistantes chez patients VIH positifs.

b) Traitement préventif

Le traitement préventif administré varie en fonction du statut immunitaire du patient. Deux modalités de traitement préventif sont actuellement préconisées : le traitement prophylactique et le traitement anticipé ou traitement préemptif. Dans cette indication, le valganciclovir a très largement remplacé le ganciclovir. Le valaciclovir est également préconisé chez certains patients.

❖ **Traitement prophylactique**

Le traitement prophylactique s'adresse aux sujets à haut risque de développer une maladie à CMV : receveurs de greffe sous traitement immunosuppresseur, ou patients au stade de SIDA, dont le nombre de cellules T CD4+ est inférieur à 100/mm³. Pour les patients infectés par le VIH, la prophylaxie reposait sur l'administration orale de ganciclovir à la dose de 5 mg/Kg/12h/21j puis 5 mg/Kg/3 semaines/2 mois, récemment remplacée par le valaciclovir. Pour le receveur d'organe solide, de moelle osseuse ou de cellules souches hématopoïétiques, le traitement prophylactique repose sur l'administration de ganciclovir par voie intraveineuse ou de valganciclovir par voie orale (Mazeron 1997; Alain and Mazeron 2001). Le valganciclovir est utilisé pour le traitement prophylactique des maladies à CMV chez des patients infectés par le VIH ou chez les transplantés. Le valaciclovir, prodrogue de l'aciclovir a également une indication en prophylaxie de la maladie à CMV après transplantation rénale ou hépatique.

L'aciclovir par voie intraveineuse, à la dose de 500 mg/m²/3j, ou le valaciclovir par voie orale, à la dose de 2 g/4j, sont aussi utilisés pour la prophylaxie des infections à CMV chez le transplanté de moelle.

❖ **Traitement préemptif**

Le traitement préemptif peut être mis en place pour traiter les sujets développant une infection active asymptomatique détectée biologiquement par antigénémie pp65, par PCR ou par culture virale. Le traitement est alors effectué par administration orale de valganciclovir, à la dose de 900 mg/12h, ou par administration par voie intraveineuse de ganciclovir, à la dose de 5 mg/Kg/12h, ou de foscarnet à la dose de 90 mg/Kg/12h. La difficulté des traitements préemptifs est de définir le seuil biologique prédictif de la maladie à CMV à partir duquel initier le traitement.

Molécules utilisées pour la prophylaxie, le traitement préventif et le traitement curatif des infections à CMV

Molécule	Mécanisme d'action	Commentaires
Ganciclovir, GCV Cymévan®	Analogue nucléosidique monophosphaté par la phosphoprotéine kinase virale ppUL97 Inhibiteur compétitif de l'ADN polymérase virale pUL54	Mutations de résistance décrites sur <i>UL97</i> et <i>UL54</i> Différents effets indésirables décrits : Toxicité hématologique : leuconutropénies sévères, thrombocytopénies Troubles neurologiques : ataxie, coma, crises compulsives Troubles rénaux : hématurie et hypercréatinémie Peu d'interactions médicamenteuses Biodisponibilité : 8-9% Demi-vie intracellulaire : 12 heures
	Voie intraveineuse	Demi-vie plasmatique : 2,5-2,9 heures
	Voie orale	Concentration maximale plasmatique (C _{max}) 2,9 µg.mL ⁻¹ pour 5 mg/kg Demi-vie plasmatique : 7,7 heures
	Implants intravitréens	Demi-vie : 13,3 heures
Valganciclovir, Val-GCV Rovalcyte®	Même mécanisme que le GCV Ester valiné du GCV	Biodisponibilité : 60% Concentration maximale plasmatique (C _{max}) 5,6 µg.mL ⁻¹ pour 5 mg/kg
	Voie orale	Mêmes effets indésirables que le GCV
Cidofovir, CDV Vistide®	Analogue nucléosidique monophosphaté Inhibiteur compétitif de l'ADN polymérase virale pUL54	Mutations de résistance simple ou croisée avec GCV +/- PFA décrites sur <i>UL54</i> Différents effets indésirables décrits : Troubles rénaux : protéinurie et hypercréatinémie Troubles digestifs : nausées et vomissements Autres troubles : fièvres, asthénie, alopecie, uvéite antérieure, rash cutané, baisse de la pression intraoculaire et neuropathie périphérique Peu d'interactions médicamenteuses, pas d'interaction avec le GCV Demi-vie plasmatique : 17 à 65 heures Concentration maximale plasmatique (C _{max}) 20 µg.mL ⁻¹ pour 5 mg/kg
	Voie intraveineuse	
Foscarnet, PFA Foscavir®	Analogue de pyrophosphate Inhibiteur compétitif de l'ADN polymérase virale pUL54	Mutations de résistance simples ou croisées avec CDV +/- GCV décrites sur <i>UL54</i> Différents effets indésirables décrits : Troubles rénaux : hypercréatinémie et insuffisance rénale Troubles digestifs : nausées et vomissements
	Voie intraveineuse	Autres troubles : hypocalcémie, anémie, ulcérations péniennes et crises convulsives Demi-vie plasmatique : 3,4 à 6 heures Concentration maximale plasmatique nécessaire (C _{max}) 220-240 µmol.L ⁻¹ Peu d'interactions médicamenteuses

Table 5 : Caractéristiques des molécules utilisées pour le traitement, la prophylaxie et la prévention des infections à CMV.

Molécules utilisées pour la prophylaxie, le traitement préventif et le traitement curatif des infections à CMV		
Molécule	Mécanisme d'action	Commentaires
Fornivirsén Fomivirsén®	Oligonucléotide antisens Inhibiteur de la traduction des gènes très précoces du CMV	Préconisé pour le traitement des rétinites chez le sujet atteint de SIDA Faible biodisponibilité Actif sur les souches résistantes au GCV, CDV, et PFA Pas d'interaction médicamenteuse
	Voie intravitéennes	
Aciclovir, ACV et Valaciclovir Valtrex®	Analogue nucléosidique Inhibiteur compétitif de l'ADN polymérase virale pUL54	Action et caractéristiques similaires à celle du GCV mais efficacité moindre Utilisé en traitement prophylactique chez les immunodéprimés seulement Biodisponibilité : 15% pour ACV, 54% pour val-AV Demi-vie plasmatique : 2 à 3 heures; demi-vie intracellulaire à 2 heures Différents effets indésirables décrits : Néphropathie réversible Troubles digestifs Troubles neurologiques
	Voie orale	
Maribavir Benzimidavir®	Dérivé benzimidazolé Ribonucléosidique Inhibiteur du transit extranucléaire du virion, produit une tégumentation précoce des virions par inhibition de ppUL97	L Différentes études ont montré son efficacité pour le traitement préventif des infections à CMV chez les immunodéprimés et pour le traitement préventif des infections congénitales Mutations de résistance décrites sur UL97 et UL27 Nouvelle classe d'antiviraux agissant sur une cible autre que la synthèse de l'ADN viral ce qui apporte différents avantages : Pas de résistance croisée avec les molécules actuelles : GCV, CDV et PFA Pas de toxicité
	Etudes en cours	
BDCRB/TCRB et dérivés	Dérivés benzimidazolés D-Ribonucléosidiques Inhibiteur de l'encapsulation du génome viral, agit sur les protéines terminases du complexe d'encapsulation	Différentes études ont montré son efficacité pour l'inhibition de la réplication du CMV Mutations de résistance décrites sur UL56, UL89, et UL104 Aucun effet secondaire répertorié Essais cliniques stoppés à cause d'une très faible biodisponibilité
	Développement en cours	Développement en cours de nombreux dérivés pour pallier le manque de biodisponibilité Nouvelle classe d'antiviraux agissant sur une cible autre que la synthèse de l'ADN viral ce qui apporte différents avantages : Pas de résistance croisée avec les molécules actuelles : GCV, CDV et PFA Pas de toxicité
Immunoglobulines en intraveineux	Immunité humorale passive anti-CMV	Différentes études randomisées montrent leur efficacité en particulier dans le cadre du traitement prophylactique des infections à CMV chez les receveurs de rein ou de cellules souches hématopoïétiques ; ces résultats restent controversés Actif sur les souches résistantes au GCV, CDV, et PFA Pas d'interaction médicamenteuse Absence de toxicité

3. Vers un vaccin contre le CMV ?

La vaccination pourrait permettre de protéger les sujets à risque des complications graves associées à la primo-infection. La vaccination pourrait ainsi être destinée aux transplantés séronégatifs ou aux femmes séronégatives avant une grossesse. Les premières tentatives de développement de vaccins contre le cytomégalovirus remontent aux années 70. La stratégie vaccinale s'appuyait alors sur des vaccins vivants atténués produits à partir de la souche de référence Towne puis de la souche AD169 (Elek and Stern 1974; Neff, Weibel *et al.* 1979). Cependant, les essais de ces premiers vaccins vivants atténués ont montré des résultats décevants (Stern 1984). Vers la fin des années 80, des vaccins vivants atténués permettant de déclencher une réponse immunitaire satisfaisante ont été obtenus (Gonczol, Ianacone *et al.* 1989; Plotkin, Starr *et al.* 1989). De nombreuses études suggèrent que ce vaccin atténué produit à partir de Towne est bien toléré chez les sujets séronégatifs ou séropositifs (Schleiss 2005). Cependant, même si ce vaccin induit une réponse immunitaire humorale et cellulaire satisfaisante, la vaccination reste moins protectrice que l'immunité naturelle (Adler, Starr *et al.* 1995). Ces mêmes études suggèrent que cette immunité limitée tiendrait au protocole d'atténuation utilisé qui a conduit à la délétion d'un grand fragment de génome au niveau du segment unique long (Hahn, Revello *et al.* 2004; Germa, Percivalle *et al.* 2005). Il est en effet connu que certains gènes de cette région sont impliqués dans les interactions du virus avec le système immunitaire, et leur absence peut expliquer la diminution de la réponse (cf. paragraphe I-4-Réponse immunitaire). Afin de pallier ce problème, une souche vaccinale recombinante intermédiaire a été construite. Cette souche vaccinale chimérique Towne/Toledo est produite par la substitution de longs fragments du génome de Toledo par leurs homologues venant de la souche Towne (Schleiss and Heineman 2005). Le but est de constituer une souche vaccinale intermédiaire, quant au niveau d'atténuation, permettant d'obtenir une réponse immunitaire aussi proche que possible de l'immunité naturelle (Schleiss 2005).

D'autres études visant à développer un vaccin efficace contre le CMV, induisant une réponse cellulaire et humorale forte, sont en cours. Les vaccins recombinants protéiques s'appuient sur la forte immunogénicité de la glycoprotéine d'enveloppe gB : la majorité des anticorps neutralisants produits au cours de la réponse immunitaire après infection à CMV sont spécifiques de cette protéine (Britt, Vulger *et al.* 1990). Le gène de la glycoprotéine gB recombinante utilisé pour l'immunisation est génétiquement modifié à 2 niveaux pour faciliter sa purification et pour augmenter son immunogénicité. D'une part, un codon stop destiné à

produire une protéine dépourvue de sa séquence de localisation transmembranaire a été ajouté. D'autre part une mutation ponctuelle permet d'éliminer un site de clivage protéolytique et donc de produire une gB non clivée. (Spaete 1991). L'évaluation de l'efficacité de ce type de vaccins est en cours (Schleiss 2005; Schleiss and Heineman 2005).

Une autre stratégie vaccinale s'appuie sur l'utilisation de vecteurs vaccinaux tels les poxvirus qui sont des candidats prometteurs pour la vaccination en raison de leur capacité à stimuler l'immunité cellulaire. Le principe de cette stratégie s'inspire des thérapies géniques et peut être comparée à celle du cheval de Troie : le vecteur vaccinal sert à transporter le gène codant la ou les protéines immunogènes chez le sujet. L'expression de ces gènes permet alors d'immuniser le sujet. Le vecteur poxvirus, le plus adapté au développement d'un vecteur vaccinal, est un canarypox aussi nommé ALVAC (Gonczol, Berensci K *et al.* 1995). La stratégie antivirale s'appuie sur la capacité des ALVAC à incorporer de grands fragments d'ADN étrangers. Différents vecteurs ont été produits ; ils permettent une immunisation contre la glycoprotéine d'enveloppe gB ou la phosphoprotéine du tégument pp65 (Wang, C. *et al.* 2004; Wang, La Rosa *et al.* 2004). Plusieurs études destinées à évaluer cette stratégie antivirale sont en cours (en phase clinique I pour certaines) (Schleiss 2005).

Les vaccins à ADN s'appuient sur le même principe que les vecteurs vaccinaux mais font appel à des vecteurs plasmidiques et non à des vecteurs viraux. A l'instar, des ALVAC, cette stratégie est utilisée pour immuniser les sujets contre la glycoprotéine d'enveloppe gB et/ou la phosphoprotéine pp65. L'évaluation de ces vaccins à ADN sur des modèles animaux a montré qu'ils induisaient une bonne immunisation puisqu'ils provoquaient une réponse humorale et cellulaire (Temperton 2002). Différentes études pré-cliniques sont en cours pour vérifier l'efficacité de ces vecteurs plasmidiques vaccinaux (Evans, Wloch M *et al.* 2004).

Récemment, une nouvelle stratégie de vaccination a été développée partant d'une immunisation vis-à-vis d'épitopes et non de protéines entières. Cette stratégie vaccinale s'appuie ainsi sur une immunisation à l'aide des peptides synthétiques imitant les épitopes principaux des protéines virales immunogènes. Différentes études précliniques ont montré l'efficacité de cette stratégie qui pourrait être mise en œuvre en prévention des infections post-greffe (BenMohamed, Krishnan *et al.* 2000; Zaia, Gallez-Hawkins *et al.* 2001; Paston, Dodi *et al.* 2004).

Enfin, une autre stratégie originale pour la vaccination contre le CMV s'appuie sur l'utilisation des corps denses (DBs : *Dense Bodies*). Ces corps denses sont des particules non infectieuses (virions dépourvus d'ADN) formées durant la réplication du CMV *in vivo* ou, en plus grande quantité, en culture cellulaire (Irmier and Gibson 1983). Les glycoprotéines

d'enveloppe gB et gH et les phosphoprotéines du tégument dont pp65, qui sont les principales cibles antigéniques du CMV, sont contenues dans ces DBs. L'inoculation de ces corps denses sur des modèles animaux a induit une réponse cellulaire et une production d'anticorps neutralisants. Ces études suggèrent que les corps denses pourraient constituer une voie intéressante pour le développement de vaccins sub-unitaires de nouvelle génération destinés à la prévention des infections à CMV (Pepperl-Klindworth, Munster *et al.* 2000; Pepperl-Klindworth, Frankenberg *et al.* 2003).

4. Résistances

Pour revue, Mazon et Ducancelle, 2001

a) Généralités

Comme cela a été développé précédemment (Paragraphe III-1-a) les antiviraux les plus utilisés, le ganciclovir, le cidofovir et le foscarnet sont trois inhibiteurs de l'ADN polymérase virale qui ciblent la réplication du CMV et ne permettent donc pas d'éradiquer le virus. Il est ainsi fréquent qu'une réplication à bas bruit persiste, malgré le traitement, associée ou non à des signes cliniques d'infection à CMV. Cette persistance peut être mise en évidence par une virémie, une antigénémie, et/ou une ADNémie positives. Les traitements sont en outre associés à de nombreux effets indésirables, c'est pourquoi ils sont administrés à posologie réduite. Enfin, ils sont généralement administrés tant que l'immunodépression persiste et donc durant de longues périodes (Gilbert and Boivin 2005). De nombreuses études ont montré que ces trois aspects du traitement des infections à CMV : persistance du virus, traitement prolongé et posologie réduite, sont des facteurs favorisant l'émergence de souches résistantes (Stanat, Reardon *et al.* 1991; Drew, Miner *et al.* 1993; Chou, Guentzel *et al.* 1995; Mazon 1997; Jabs, Enger *et al.* 1998; Chou 1999; Erice 1999; Emery and Griffiths 2000; Emery 2001). L'apparition des mutants résistants est souvent associée à une aggravation de la symptomatologie clinique et conduit à des impasses thérapeutiques, non pas du fait d'une pathogénicité accrue des souches résistantes, mais à cause de la réactivation de l'infection à CMV (Gilbert and Boivin 2005).

En 2000, les travaux de Emery et coll. ont permis de mieux appréhender la cinétique de l'émergence des souches résistantes à l'aide d'un modèle mathématique (Emery and Griffiths 2000). Il a ainsi été montré, *in vivo*, que l'émergence de la souche résistante était la conséquence de l'évolution exponentielle de deux populations distinctes : des souches sensibles, dont la souche sauvage, et la souche mutante résistante (fig 9). La pression de sélection permet l'inhibition de la réplication des souches sensibles et l'émergence des mutants résistants. Emery et coll. ont ainsi montré qu'une population de mutants correspondant à 0,5 % de la population virale totale en début de traitement atteignait 30 % après 145 jours de traitement et 90 % après 150 jours (Emery and Griffiths 2000).

La cinétique de l'émergence des souches résistantes permet de comprendre en quoi la persistance d'une réplication virale constitue un facteur de risque dans le développement de la résistance. Ce risque dépend directement de la charge virale initiale.

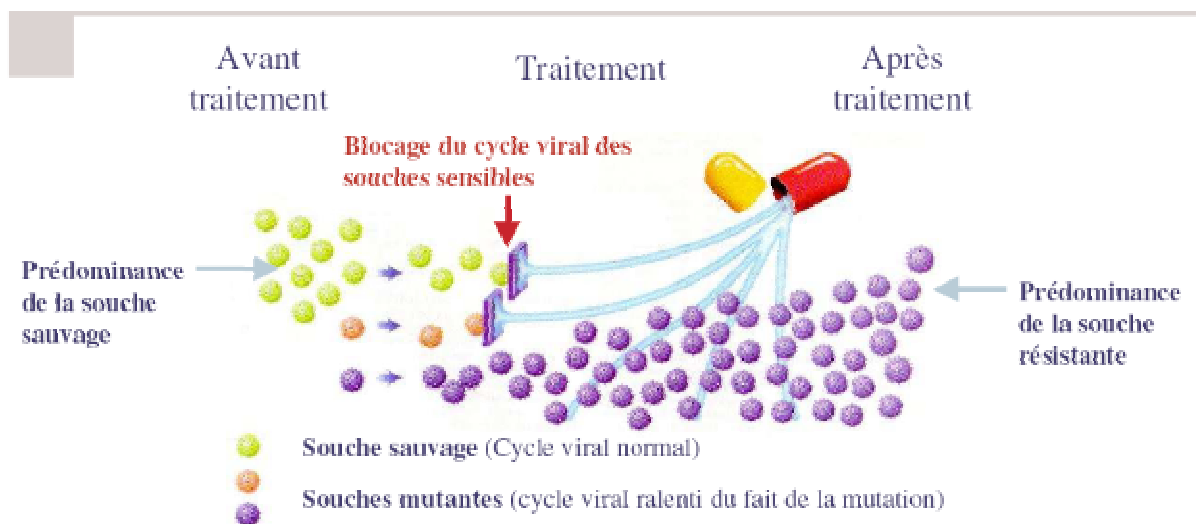


Figure 9 : Cinétique de l'émergence des souches virales résistantes.

Avant l'application du traitement, différentes souches cohabitent chez le patient : la souche sauvage sensible et différents mutants générés par des erreurs ponctuelles apparues au cours de la réplication de l'ADN viral. Les mutants restent généralement minoritaires du fait même de la présence de mutations qui peuvent limiter leur capacité répliquative. Alors que l'administration du traitement bloque la réplication de toutes les souches sensibles, les mutants portant une mutation associée à une résistance continuent à se répliquer. Ces derniers deviennent majoritaires en quelques semaines si la pression de sélection est maintenue.

b) Incidence de la résistance

L'émergence de la résistance reste un problème d'actualité chez les transplantés du fait du maintien de l'immunosuppression. Elle participe à l'augmentation du nombre d'épisodes virémiques symptomatiques ou asymptomatiques débouchant généralement sur des maladies à CMV ou sur le rejet du greffon avec une élévation du risque de décès (Bhorade, Lurain *et al.* 2002). Ainsi, en cas de persistance de l'immunosuppression, l'isolement d'une souche résistante après greffe de moelle ou transplantation d'organe solide est fréquemment associé à une augmentation de la morbidité (Erice, Chou *et al.* 1989; Alain, Honderlick *et al.* 1997; Erice, Borrell *et al.* 1998). De nombreuses études ont permis d'estimer l'incidence de la résistance en s'appuyant sur des outils phénotypiques ou génotypiques de détection des souches résistantes.

Toutes ces études ont montré que la résistance au GCV, révélée par une CI50 (concentration inhibitrice à 50 % ; cf paragraphe III-4-d) supérieure à 6µM, avait une incidence faible en début de traitement avec un taux inférieur à 2,7 % (Jabs, Enger *et al.* 1998; Boivin, Gilbert *et al.* 2001). Au contraire, l'incidence de la résistance augmente avec la durée du traitement. Les greffés pulmonaires sont les plus touchés avec une incidence de la résistance au GCV variant, suivant les études, entre 3,6 et 27 % après 3 mois de traitement (Kruger, Shannon *et al.* 1999; Limaye, Raghu *et al.* 2002; Lurain, Bhorade *et al.* 2002). L'incidence de la résistance au GCV est aussi élevée chez les receveurs de greffe rein-pancréas, avec un taux variant entre 13 et 21 %. Ce taux est de 3,5 % chez les greffés rénaux, 2,3 % chez les greffés cardiaques, et 1,4 % chez les receveurs de foie (Limaye, Corey *et al.* 2000; Lurain, Weinberg *et al.* 2001).

Une seule étude prospective de l'incidence de la résistance après traitement au valganciclovir est disponible. Elle a été réalisée en 2001 par l'équipe de Boivin *et coll.* et a permis de comparer l'incidence de la résistance sur deux populations de transplantés traités, par voie orale, au GCV ou au Val-GCV (Boivin, Gilbert *et al.* 2001). Alors que l'incidence de la résistance atteignait 1,9 % à la fin du traitement prophylactique, et 6,1 % après 1 an de traitement chez les patients traités par GCV, aucune souche résistante n'a été détectée chez les patients traités par Val-GCV. Cependant, l'étude a été réalisée sur 301 sujets n'incluant que peu de transplantés rein/pancréas (11/301) expliquant le faible taux d'émergence de résistance après traitement au GCV. Cette différence dans l'impact de l'administration par voie orale du GCV ou de sa prodrogue le Val-GCV est probablement la conséquence de la meilleure biodisponibilité du Val-GCV. Ceci montre que le Val-GCV constitue une alternative

intéressante pour la prophylaxie des infections à CMV (Boivin, Gilbert *et al.* 2001; Gilbert and Boivin 2005).

Peu d'études se sont intéressées à l'incidence des résistances au CDV ou au PFA puisqu'ils ne sont utilisés qu'en cas d'échec thérapeutique du traitement par GCV (Boivin, Gilbert *et al.* 2001).

Chez les patients infectés par le VIH, l'utilisation des trithérapies permet désormais de lutter efficacement contre l'infection et donc de maintenir un niveau immunitaire satisfaisant. L'incidence des co-infections par le CMV a ainsi diminué de 80 % depuis 1996, réduisant d'autant l'incidence des maladies à CMV graves chez ces sujets. L'utilisation des traitements antiviraux anti-CMV dans cette classe de population est donc très limitée. Aussi, à l'heure actuelle, l'incidence de la résistance au GCV, CDV, ou PFA, chez ces patients est presque nulle.

Toutefois, différentes études, réalisées avant l'utilisation des trithérapies, avaient montré l'importance de la résistance dans cette classe de population. L'étude de Jabs et coll., réalisée sur des patients traités pour rétinites à CMV, montre que l'incidence de la résistance au GCV est respectivement de 7, 12, 27, et 27 % après 3, 6, 9, et 12 mois de traitement (Jabs, Enger *et al.* 1998). Une étude plus récente de Boivin et coll. montre une incidence de la résistance au GCV respectivement de 2, 7, 9, et 13 % après 3, 6, 9, et 12 mois de traitement (Boivin, Gilbert *et al.* 2001). Chez les sujets traités au PFA l'étude de Jabs et coll. révèle une incidence de la résistance de 9, 26, 37 et 37 % après respectivement 3, 6, 9 et 12 mois de traitement (Jabs, Enger *et al.* 1998). Une étude plus récente, de cette même équipe, montre des taux inférieurs, de l'ordre de 13, 24, et 37 % après respectivement 6, 9 et 12 mois de traitement (Weinberg, Jabs *et al.* 2003). Les études concernant l'incidence de la résistance au CDV, sont moins nombreuses, mais les données disponibles montrent des valeurs proches de l'incidence de la résistance au GCV et au PFA (Jabs, Enger *et al.* 1998; Gilbert and Boivin 2005).

c) Mécanisme moléculaire de la résistance aux antiviraux

L'émergence des résistances est liée à l'apparition de mutations ponctuelles au sein des gènes codant les protéines cibles des antiviraux ou intervenant dans leur mécanisme d'action. Ainsi deux gènes sont impliqués dans la résistance aux inhibiteurs de la réplication de l'ADN viral : *UL54* et *UL97*.

Le défaut de phosphorylation du ganciclovir est un mécanisme majeur de résistance pour les isolats cliniques et les souches de laboratoire (Stanat, Reardon *et al.* 1991). Les mutations

de résistance au GCV portent sur les acides aminés 460, 520 et 590 à 607. L'ensemble des sites de résistance au GCV, au sein de la protéine pUL97, est listé dans la figure 10. En pratique clinique, les mutations associées à une résistance les plus fréquemment détectées (60 à 80 % des souches résistantes) portent sur les acides aminés 460 (M→V/I), 594 (A→V), et 595 (L→S) (Erice 1999; Chou, Waldemer *et al.* 2002; Lurain, Bhorade *et al.* 2002). Ces mutations de la protéine pUL97 conduisent généralement à de bas niveaux de résistance.

Si le traitement se prolonge (au-delà de 9 mois en moyenne), des mutations peuvent aussi apparaître au sein du gène *UL54*, codant l'ADN polymérase virale, s'ajoutant, le plus souvent, aux mutations du gène *UL97* (cf paragraphe IV-2). L'ensemble des sites de mutation induisant des résistances au GCV, au sein de l'ADN polymérase pUL54, est listé dans la figure 11. Ces modifications conduisent à de hauts niveaux de résistance au ganciclovir, associées à une résistance au cidofovir (Erice 1999; Lurain, Bhorade *et al.* 2002; Chou, Lurain *et al.* 2003). Des mutations entraînant une résistance croisée au ganciclovir et au foscarnet, peuvent aussi survenir mais avec une incidence moindre. Ces mutations sont localisées dans des régions différentes de l'ADN polymérase virale et n'altèrent pas la sensibilité au cidofovir.

Enfin, des associations de mutations multiples de pUL97 et/ou pUL54 peuvent survenir si l'immunosuppression est maintenue et si le traitement se prolonge (Chou, Marousek *et al.* 1997; Smith, Cherrington *et al.* 1997). Ces associations de mutations conduisent, selon les cas, à une résistance isolée au ganciclovir (mutations limitées au gène *UL97*), à une résistance de haut niveau au ganciclovir associée à une résistance au cidofovir, à une résistance croisée au ganciclovir et au foscarnet, ou à une résistance croisée aux trois molécules (mutations multiples au sein des gènes *UL97* et *UL54*). Ces associations de mutations résultent soit de l'accumulation de mutations sur une même souche, soit de la coexistence de plusieurs souches mutées dérivant ou non d'une même souche initiale. La possibilité d'effet compensateur entre deux mutations de pUL97 en position 594 et 605 a aussi été démontrée (Ijichi, Michel *et al.* 2002).

d) Outils de détection et d'étude des souches de CMV résistantes aux antiviraux

Le maintien d'une antigénémie, d'une virémie ou d'une ADNnémie positive, sous traitement bien conduit doit amener les cliniciens à suspecter la présence d'une souche résistante. La résistance peut être diagnostiquée par la détection d'une souche résistante

circulante ou localisée au site d'infection. Elle peut être effectuée par différentes techniques de diagnostic phénotypique ou génotypique.

❖ Méthodes phénotypiques

Les techniques phénotypiques consistent en la mise en évidence du phénotype de résistance de la souche responsable de l'infection. Elles nécessitent l'isolement et la culture de la souche et permettent d'évaluer son niveau de résistance. La technique de référence s'appuie sur le calcul de la concentration inhibitrice à 50 % (CI50) ou à 90 % (CI90) c'est-à-dire la concentration d'antiviral nécessaire pour réduire la réplique de la souche étudiée de 50 % ou de 90 % (Houhou-Fidou, Mazon *et al.* 1998). Différentes techniques permettent de mesurer la CI50 ou la CI90. La technique de base s'appuie sur la mesure de la réduction du nombre de plages de lyse après 14 jours de culture. Les techniques actuelles les plus utilisées dérivent de cette dernière et consistent en la mesure du nombre de foyers d'effet cytopathique ou de cellules infectées produisant des antigènes viraux. Les cellules infectées sont révélées par immunoperoxydase, par ELISA *in situ* (Drew, Miner *et al.* 1993; Prix, Maierl *et al.* 1998; Landry, Stanat *et al.* 2000), ou par cytométrie en flux (Lee, Lee *et al.* 2005). Dans ces techniques, les cellules infectées, au sein desquelles le CMV réplique, sont révélées par détection des antigènes très précoces du virus à l'aide d'un anticorps monoclonal spécifique dirigé contre un antigène très précoce. Des techniques indirectes, moins utilisées, permettent d'évaluer le niveau de réplique du virus par détection des acides nucléiques viraux : quantification de l'ADN viral par hybridation *in situ* ou de l'ARN viral par dot blot.

Ces techniques ont l'avantage d'être très sensibles, et de permettre d'évaluer la capacité réplique des souches étudiées. Elles souffrent toutefois de quelques désavantages, puisqu'elles nécessitent l'isolement et la culture de la souche virale. Elles requièrent ainsi des délais importants et manquent de standardisation entre les différents laboratoires. La valeur de la CI50 du GCV de la souche de référence AD169 varie ainsi d'un facteur 16 (0,5 à 8 μ M) selon les études (Drew, Miner *et al.* 1993; Snoeck, Andrei *et al.* 1996). Pour pallier ce problème, le groupe CMV AC11 de l'ANRS (action coordonnée n°11 de l'association nationale de recherche sur le SIDA) a défini une technique consensus permettant l'harmonisation de l'interprétation des résultats et leur comparaison par la détermination de l'indice de sensibilité à 50 % ou IS50. L'IS50 correspond ainsi à la CI50 de la souche étudiée, divisée par la CI50 de la souche de référence (généralement AD169), testée au cours du même essai. Une souche peut être considérée comme résistante lorsque sa CI50 est au moins 3 fois

supérieure à celle de la souche de référence, c'est-à-dire lorsque son IS50 est supérieur ou égal à 3 (Mazeron, Alain *et al.* 1994). Certains auteurs anglosaxons utilisent en référence la CI50 moyenne d'un panel d'isolats sauvages testés dans leur laboratoire (Chou, Guentzel *et al.* 1995).

Une méthode plus récente, dite du virus recombinant vaccinal (rVV pour *recombinant vaccinal virus*) permet d'évaluer directement le phénotype de résistance par mesure de l'impact d'une mutation sur l'activité de phosphorylation du ganciclovir (Metzger, Michel *et al.* 1994). Le gène *UL97* muté et le gène sauvage, qui sert de contrôle, sont clonés dans des plasmides puis insérés par recombinaison homologue, dans des virus vaccinaux naturellement résistants au ganciclovir, afin de mesurer le niveau de phosphorylation du ganciclovir induit par ces virus vaccinaux recombinants. Les virus sont ensuite utilisés pour infecter des cellules 143B dépourvues d'activité tyrosine kinase. Après vérification des niveaux d'expression du gène *UL97* pour les deux virus, par western blot, le niveau de phosphorylation du ganciclovir des extraits cellulaires est mesuré par chromatographie en phase liquide, HPLC (*High Performance Liquid Chromatography*). La comparaison entre l'activité de phosphorylation du ganciclovir par la kinase sauvage et la kinase mutée permet de mesurer le phénotype de résistance associé à la mutation (Metzger, Michel *et al.* 1994; Michel, Pavic *et al.* 1996; Michel, Schaarschmidt *et al.* 1998).

❖ Méthodes génotypiques

L'étude du génotype de résistance repose sur la recherche directe des mutations de résistance à partir de l'ADN viral extrait des produits pathologiques ou de l'isolat clinique. Les méthodes actuellement utilisées pour la détection des mutations de résistance sont basées sur l'analyse du profil de restriction des gènes *UL97* et *UL54* (Prix, Maierl *et al.* 1998; Prix, Hamprecht *et al.* 1999) ou sur des techniques d'hybridation (Zhou, Harder *et al.* 1999). Ces méthodes ne permettent pas de mettre en évidence les mutations nouvelles et les polymorphismes dont la connaissance pourrait être importante pour la compréhension des mécanismes de résistance ou dans le cadre d'études épidémiologiques. La détection des mutations par séquençage des régions des gènes *UL97* et *UL54* contenant les mutations de résistance est également utilisée (Chou, Guentzel *et al.* 1995; Jabs, Martin *et al.* 2001; Jabs, Martin *et al.* 2001; Lurain, Weinberg *et al.* 2001; Chou, Lurain *et al.* 2003).

La bonne corrélation entre le phénotype de résistance et le génotype justifie l'utilisation de tests de résistance basés sur le génotypage des isolats de CMV (Mazeron, Alain *et al.* 1994;

Jabs, Martin *et al.* 2001; Jabs, Martin *et al.* 2001; Lurain, Bhorade *et al.* 2002). De plus, ces techniques génotypiques ont pour avantage de réduire fortement les délais d'analyses et de permettre une bonne standardisation des essais. Les méthodes génotypiques ont cependant pour inconvénient de ne donner aucune information quant à la capacité répliquative et au niveau de résistance des souches étudiées. Il est alors nécessaire, lorsqu'une mutation inconnue est détectée, de compléter l'étude génotypique par une étude phénotypique à partir de l'isolat clinique ou d'une souche recombinante. Le transfert de la mutation à étudier à un virus sauvage de référence, générant un virus recombinant, ou transfert de marqueur, est la technique de référence permettant de vérifier l'implication d'une mutation dans le processus de résistance et de mesurer le niveau de résistance qu'elle engendre (Erice, Gil-Roda *et al.* 1997; Erice, Borrell *et al.* 1998; Chou 1999; Chou, Waldemer *et al.* 2002).

**Figure 10 : Représentation schématique de la phosphotransférase pUL97 ;
Localisation des sites de résistance au ganciclovir ou au maribavir**

En haut se trouve schématiquement représenté, à l'échelle, la protéine pUL97 avec les différents domaines fonctionnels : site d'autophosphorylation, site catalytique ATPasique et domaine catalytique impliqué dans la phosphorylation du GCV (en gros plan au centre de la figure), les sous domaines conservés (I à XI : rectangles jaunes) ; les flèches vertes indiquent la position des polymorphismes naturels de la protéine (différences entre souches de référence) ; les étoiles rouges représentent les sites de substitution associée à une résistance ; les barres violettes indiquent les sites de délétions associées à une résistance. Ces mutations sont listées dans la partie inférieure de la figure et classées en 5 catégories. **RM** : mutations de résistance vérifiées par transfert de marqueur ; **RAM** : mutations associées à une résistance, mais non vérifiées par transfert de marqueur ; **Ass** : mutations conférant une résistance lorsqu'elles sont associées à une autre mutation ; **ram*** : mutations associées à un défaut de phosphorylation du ganciclovir *in vitro*, mais non vérifiées par transfert de marqueur à une souche de CMV.

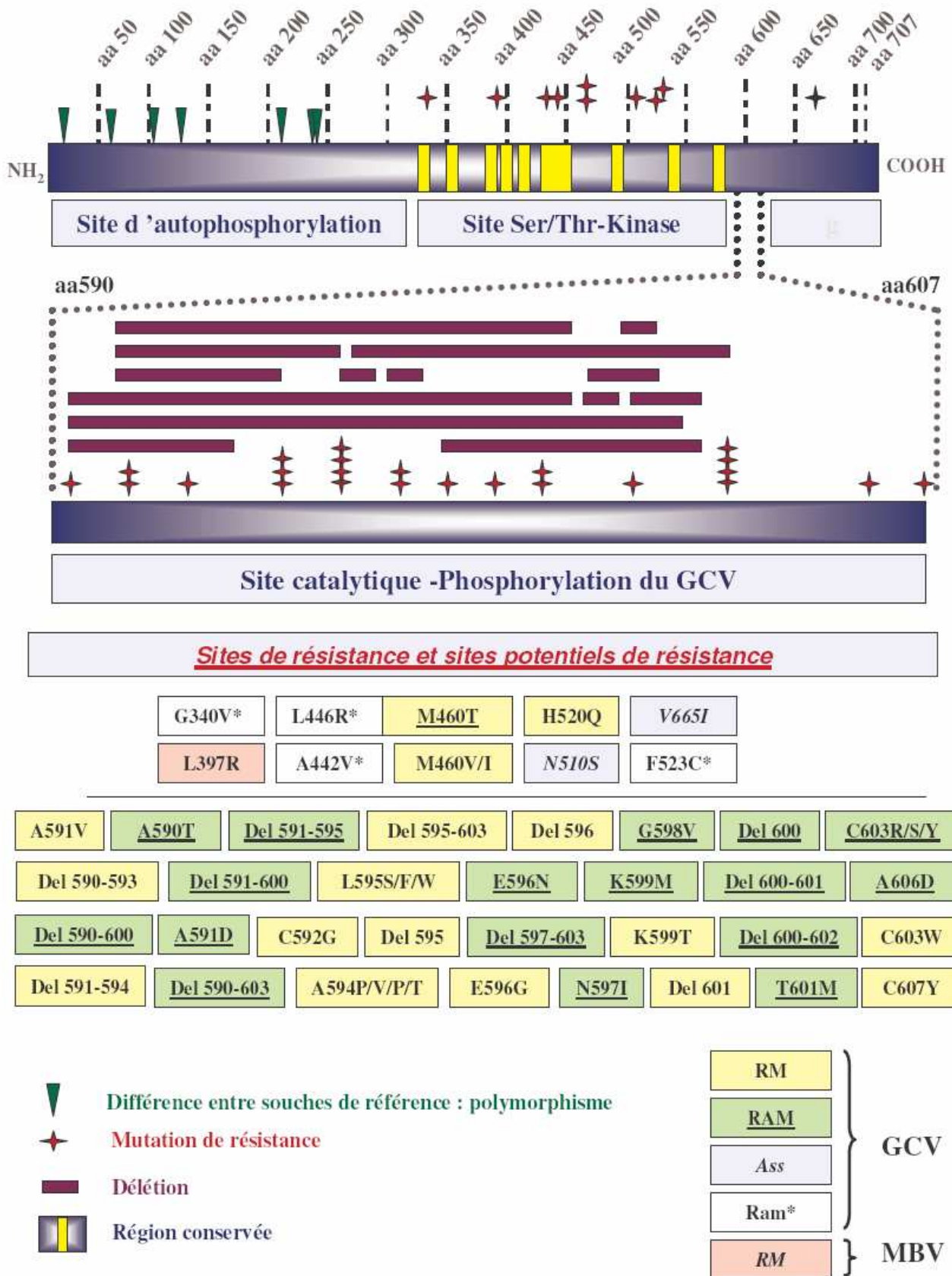
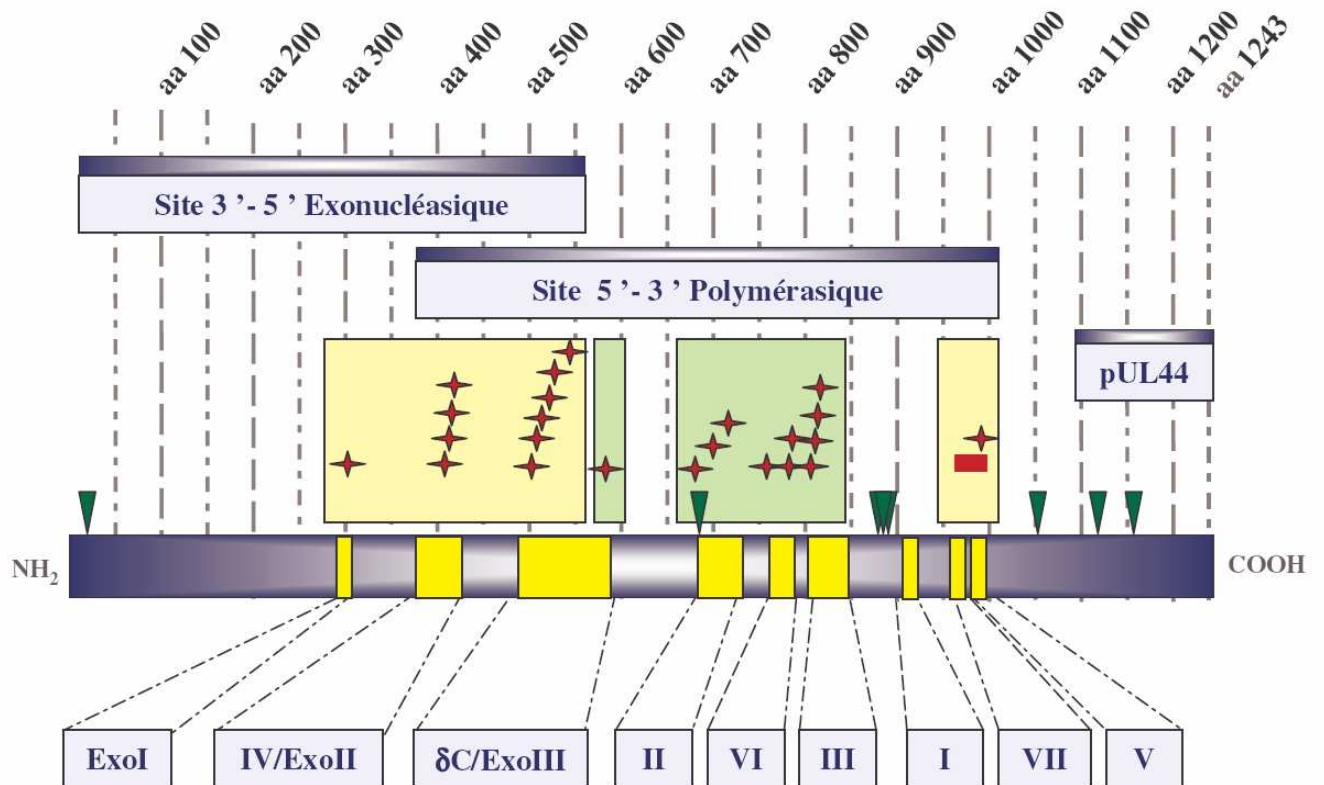


Figure 10 : Représentation schématique de la phosphotransférase pUL97 ; localisation des sites de résistance au ganciclovir



Sites de résistance et sites potentiels de résistance

D301N	D413E	L516R	A692S	E756D	Del 981-982	
N408D	L501I	P522S	T700A	E756Q	L802M	T821I
N410K	T503I	L545S	V715M	V781I	A809V	A987G
F412C	K513E	D588N	E756K	V787L	V812L	

- Différence entre souches de référence : polymorphisme
- Mutation de résistance
- Région conservée
- Délétion associée à une résistance

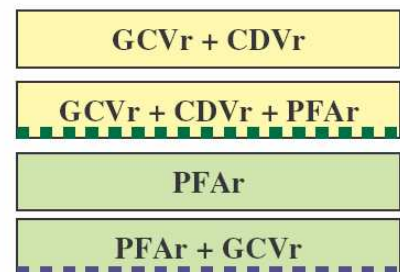


Figure 11 : Représentation schématique de l'ADN polymérase virale pUL54 ; localisation des sites de résistance aux GCV, CDV et PFA

**Figure 11 : Représentation schématique de l'ADN polymérase virale pUL54 ;
Localisation des sites de résistance aux GCV, CDV et PFA**

En haut se trouve schématiquement représenté, à l'échelle, la protéine pUL54 avec les différents domaines fonctionnels : 3'-5' exonucléasiques, 5'-3' polymérasique, et domaine de liaison à la protéine accessoire pUL44. Les rectangles jaunes indiquent la position des 12 régions conservées ; les flèches vertes indiquent la position des polymorphismes naturels de la protéine (différences entre souches de référence) ; les étoiles rouges représentent les sites de mutations associées à une résistance. Les mutations sont listées et classées par type dans la partie inférieure de la figure.

VII. Les principales cibles antivirales

1. Phosphotransférase pUL97

a) Historique

En 1989, il a été démontré que le GCV se retrouvait sous forme triphosphorylée dans les cellules infectées et faiblement phosphorylée dans les cellules saines, suggérant l'intervention d'une phosphotransférase d'origine virale (Biron, Stanat *et al.* 1985). Néanmoins, les premiers résultats de Chee et coll., ont montré que le locus du gène codant la thymidine kinase était délété et, par conséquent, que le virus ne possédait pas cette enzyme (Chee, Lawrence *et al.* 1989). Cependant quelques années plus tôt, il avait été démontré que la thymidine kinase chez l'HSV, l'EBV et le VZV était impliquée dans l'activation du GCV (Mc Knight 1980; Davison and Scott 1986; Littler, Zeuthen *et al.* 1986). Parallèlement, en 1989, Smith et Smith décrivent un nouveau groupe de gène dont la séquence suggère une homologie avec les gènes codant les kinases virales : gène *UL13* du HSV, *ORF47* (*VZV47*) du VZV, et gène *BGLF4* de l'EBV (Smith and Smith 1989). Par ailleurs, en comparant la séquence de ces gènes avec les séquences codant les sites catalytiques de différentes sérine/thréonine kinases virales ou cellulaires, ces auteurs ont montré que ces gènes codent pour des phosphotransférases appartenant à la grande famille des sérine/thréonine kinases. L'ensemble de ces résultats a conduit l'équipe de Chee et coll. à analyser le génome du CMVH et de HHV-6 à la recherche d'un homologue de la thymidine kinase et a permis la découverte des homologues des gènes *UL13*, *VZV47*, et *BGLF4*, chez le CMVH (phase de lecture HSRF3 : *UL97*) et chez HHV6 (phase de lecture *15R*) (Chee, Lawrence *et al.* 1989). L'ensemble de ces résultats est à l'origine de la découverte de la phosphotransférase pUL97, mais son implication dans la

primo-phosphorylation du GCV ne sera réellement démontrée qu'en 1992 par Littler et Sullivan (Littler, Stuart *et al.* 1992).

b) Domaines fonctionnels

La phosphotransférase pUL97 est une protéine de 707 acides aminés (aa), codés par un gène de 2124 pb (paires de bases), localisé dans le segment unique long du génome du CMVH. Il appartient à un groupe de 6 gènes (*UL93* à *UL98*) qui codent pour 6 transcrits ARN de haut poids moléculaire ayant en commun leur extrémité 3' correspondant à la séquence du gène *UL99* (Wing and Huang 1995). Tous s'expriment lors de la phase précoce ou précocetardive de la réplication virale.

La structure générale de cette protéine de 78 kDa n'est pas connue mais la compréhension de la composition des domaines catalytiques a bénéficié des travaux de Hanks qui portaient sur l'alignement de la séquence en acides aminés des sites catalytiques de 65 protéines kinases (Hanks, Quinn *et al.* 1988). Ces travaux ont permis la description de plusieurs régions conservées délimitant 11 sous-domaines (domaines conservés I à XI ou sous-domaines I à XI) qui ont été ensuite identifiés au sein des phosphotransférases de l'HSV, de l'EBV, du VZV (Smith and Smith 1989) puis de l'HHV6 et du CMVH (Chee, Lawrence *et al.* 1989).

La localisation de ces domaines conservés sur pUL97 est représentée dans la figure 10 (Hanks, Quinn *et al.* 1988; Chee, Lawrence *et al.* 1989) et leur agencement dans l'espace autour du complexe MgATP dans la figure 12.

La partie N-terminale de la protéine porte une région NLS intervenant dans la localisation nucléaire de la protéine au sein des cellules infectées. En effet, les régions NLS qui sont des régions riches en acides aminés basiques, ont la capacité de permettre l'interaction des protéines avec l'importine- α cellulaire et par conséquent le transit au niveau intranucléaire.

Le domaine conservé I contient une séquence consensus décrite dans la plupart des protéines kinases et dans de nombreuses protéines interagissant avec les nucléotides, motif GXGXXG, ₃₃₈GQGSFG₃₄₃ pour la phosphotransférase pUL97. Ce motif hautement conservé constituerait un site de liaison aux nucléotides et plus particulièrement à l'ATP dont l'hydrolyse fournit l'énergie et le phosphate nécessaire à la phosphorylation. Un modèle théorique de la structure tridimensionnelle de ce motif a pu être établi grâce à la connaissance de la structure du site catalytique des protéines interagissant avec les nucléotides (Sternberg and Taylor 1984). Les trois glycines et un résidu hydrophobe situé 2 aa en amont (V345 pour pUL97) formeraient un coude permettant l'interaction et la fixation de l'ATP (Hanks, Quinn

et al. 1988). Ce domaine se trouve par ailleurs dans un segment connu pour être le domaine d'autophosphorylation de la protéine. En effet, cette région de pUL97, située entre les acides aminés 305 à 365, est essentielle pour l'autophosphorylation de la protéine (Michel, Schaarschmidt *et al.* 1998) et pour le bon déroulement du cycle viral (Prichard, Gao *et al.* 1999). Comme pour de nombreuses phosphotransférases, l'autophosphorylation de la protéine devrait constituer une étape préalable à son activation. Dans une étude plus récente, la même équipe a démontré le rôle essentiel de l'autophosphorylation de pUL97 dans la phosphorylation du ganciclovir et donc dans l'activité antivirale de cet agent (Michel, Kramer *et al.* 1999). Dans cette même étude, Michel et coll. ont montré le rôle critique de plusieurs acides aminés dans l'autophosphorylation de la protéine : G340, A442, L446 et F523. Il n'est d'ailleurs pas étonnant que la perte de la glycine 340 soit associée à un défaut de phosphorylation du ganciclovir, puisqu'il s'agit d'un des résidus invariant du motif ${}_{338}\text{GXGXXG}_{343}$ impliqué dans la liaison à l'ATP. Ainsi, l'effet de la perte de ces différents acides aminés ayant été évalué *in vitro*, par mesure du niveau de phosphorylation du ganciclovir, ces mutations ne peuvent être considérées comme des mutations de résistance au ganciclovir tant qu'elles n'ont pas été testées par transfert de marqueur, et que leur effet sur la capacité répliquative des souches n'a pas été évalué.

Le domaine conservé II contient un résidu lysine invariant (K371 pour pUL97) généralement encadré d'une région riche en acides aminés hydrophobes et situé 14 à 23 acides aminés (12 pour pUL97) en aval de la dernière glycine du motif ${}_{338}\text{GXGXXG}_{343}$, mais l'importance de cet écart n'a pas encore été démontrée. Cette lysine joue un rôle primordial dans l'activité kinase de l'enzyme puisque sa substitution ou sa délétion entraîne la perte totale de l'activité kinase (Hanks, Quinn *et al.* 1988). Il a été suggéré qu'il s'agissait de la lysine catalytique de l'activité ATPasique, impliquée dans le transfert d'un proton au cours de l'hydrolyse de l'ATP permettant le transfert du phosphate du donneur de phosphate, l'ATP, à la molécule receveuse (Kamps and Sefton 1986).

Le domaine conservé III contient un résidu glutamate conservé dont la fonction n'a pas été déterminée. Les domaines conservés IV et V ne contiennent pas d'acides aminés invariants et leur rôle n'est pas connu.

Le domaine conservé VI est divisé en deux sous-domaines, VIA et VIB, contenant 3 résidus invariants. Il appartient, avec les domaines VII, au segment le plus conservé des protéines kinases. Le sous-domaine VIA contient un résidu histidine invariant (H448 pour pUL97) généralement précédé de 2 acides aminés hydrophobes. Le rôle de cette histidine est inconnu. Le sous-domaine VIB contient deux résidus invariants, un aspartate et une

asparagine (D456 et N471 pour pUL97). La séquence de ce sous-domaine constitue la signature qui permet de différencier les tyrosines kinases des sérine/thréonine kinases, portant respectivement les motifs consensus DLR/AooN et Do**oN (₄₅₆DITPMN₄₇₁ pour pUL97) où {o} est un résidu hydrophobe apolaire et {*} un résidu polarisable ou chargé. Les résidus invariants D et N interagissent avec le γ -phosphate et le Mg^{2+} du complexe MgATP (Hanks, Quinn *et al.* 1988).

Le domaine conservé VII porte un motif avec une séquence consensus DFG et plus généralement DØo où {Ø} est un résidu dont la chaîne latérale porte un cycle et {o} est un résidu neutre (₄₈₁DYS₄₈₃ pour pUL97). Ce motif est aussi impliqué dans la fixation et l'hydrolyse de l'ATP (Hanks, Quinn *et al.* 1988).

Le domaine conservé VIII est considéré comme l'indicateur de la proximité du site catalytique. Il contient généralement un motif conservé APE qui est majoritairement conservé chez les tyrosines kinases et peu conservé chez les sérine/thréonine kinases. Ce domaine n'est pas conservé chez pUL97 du CMVH (Hanks, Quinn *et al.* 1988).

Le domaine conservé IX contient une séquence consensus DXXXXG, ₅₇₄DEV₅₈₀RMG pour pUL97. La fonction de ce domaine n'est pas encore connue. Chez pUL97, ce motif est situé quelques acides aminés en amont du motif ₅₉₀AACR₅₉₄ dont la délétion conduit à un défaut de phosphorylation du GCV. Ce motif ₅₉₀AACR₅₉₄ se trouve à l'extrémité N-terminale du domaine considéré comme le site de phosphorylation du GCV qui contient la majorité des sites de résistance (Sullivan, Biron *et al.* 1992).

Le domaine conservé X ne contient pas d'acide aminé invariant et sa fonction n'est pas connue. Le domaine conservé XI, hormis un résidu arginine invariant, est peu conservé rendant impossible sa localisation au sein des sérine/thréonine kinases des herpèsvirus.

Les domaines conservés I à VII sont très conservés chez les herpèsvirus, contrairement aux domaines VIII à XI. Par ailleurs, la localisation des mutations de résistance au GCV, identifiées dans des mutants de laboratoire et dans des isolats cliniques, permet de situer le domaine catalytique de l'activité de phosphorylation du GCV dans la partie C-terminale de pUL97, entre les acides aminés 590 et 610. Cette région qui n'a pas d'homologue chez les autres sérine/thréonine kinases fournit ainsi à pUL97 la capacité de phosphoryler le ganciclovir et l'aciclovir. Cette activité apparaît comme une fonction secondaire de cette enzyme, puisqu'elle ne phosphoryle pas les nucléotides naturels (Michel, Schaarschmidt *et al.* 1998).

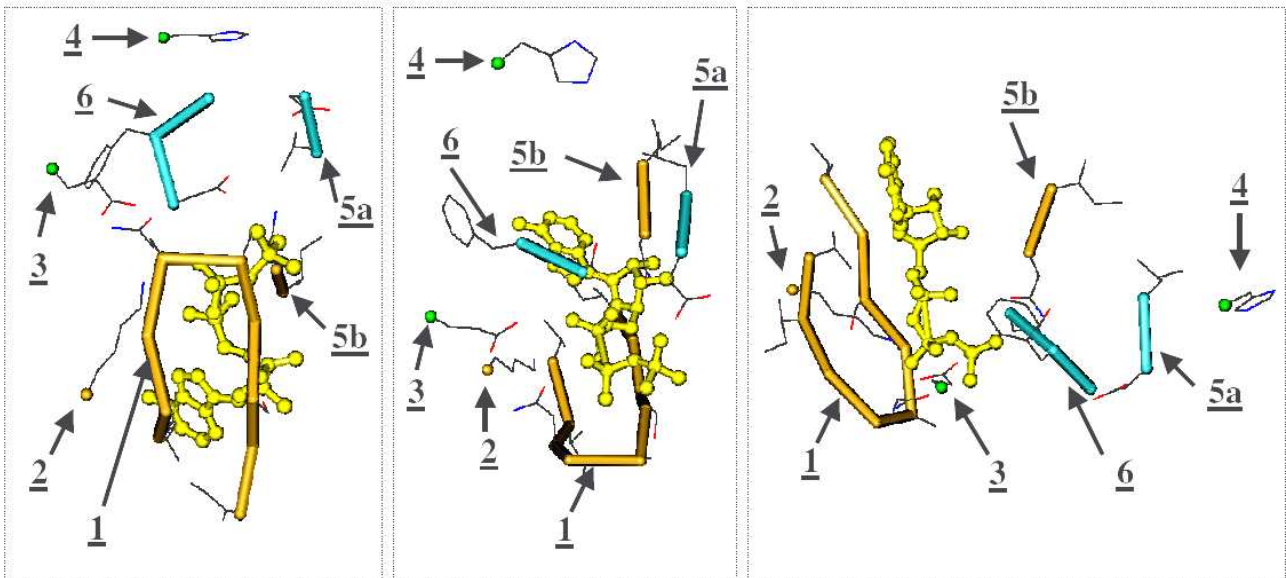


Figure 12 : Structure tridimensionnelle du site catalytique des protéines kinases.

Afin d'illustrer les données de Sternberg et coll., concernant la structure du site catalytique des protéines kinases (Sternberg and Taylor 1984) nous avons utilisé le programme Cn3D (NCBI) pour présenter l'agencement tridimensionnel des résidus formant les domaines conservés. Trois vues sont ici représentées. La molécule en jaune est la molécule d'ATP ; **1** : Motif ${}_{338}\text{GXGXXG}_{343}$ du domaine conservé I ; **2** : Lysine conservée (K371 pour pUL97) du domaine conservé II ; **3** : Glutamate conservé (E380 pour pUL97) du domaine conservé III ; **4** : Histidine conservée (H448 pour pUL97) du domaine conservé VIA ; **5** : Aspartate (a) et Asparagine (b) conservés (D456 et N461 pour pUL97) du domaine conservé VIB ; **6** : Cluster d'acides aminés conservés (${}_{481}\text{DYS}_{483}$ pour pUL97) du domaine conservé VII.

c) Fonction

L'accumulation de nombreuses données concernant pUL97 permet aujourd'hui de mieux appréhender ses fonctions naturelles au cours de la réplication virale, mais de nombreuses zones d'ombre persistent. Plusieurs études, malheureusement encore incomplètes, ont ainsi attribué différentes fonctions à pUL97, suggérant qu'elle joue un rôle central au cours de la réplication virale (figure 13).

En 1995, il a été montré que le gène *UL97* appartenait à un groupe de gènes s'exprimant lors de la phase précoce ou précoce-tardive de la réplication virale (Wing and Huang 1995). Plus récemment, les travaux de Michel et coll., ont permis de démontrer la localisation intranucléaire de pUL97 (Michel, Pavic *et al.* 1996), puis l'identification de la région impliquée dans cette localisation (Michel, Schaarschmidt *et al.* 1998). En 2001, les travaux de Wolf et coll., ont démontré que la délétion du gène *UL97*, ou l'inhibition de l'activité kinase de pUL97 par le maribavir, conduisait à une diminution substantielle de l'accumulation de

l'ADN dans le noyau (Wolf, Courcelle *et al.* 2001). Ils ont ainsi démontré que pUL97 jouait un rôle important dans la synthèse de l'ADN viral et ont suggéré, que la phosphorylation de la protéine accessoire pUL44 pourrait jouer un rôle à ce niveau. Par ailleurs, ces travaux ont révélé, que contrairement à ses homologues chez les autres herpèsvirus, pUL97 n'intervient pas dans la régulation de l'expression des gènes viraux.

Suite à ces travaux, deux études distinctes réalisées en 2003 ont montré que pUL97 avait la capacité d'interagir avec la protéine accessoire pUL44 et de catalyser sa phosphorylation. La protéine pUL44 ainsi phosphorylée serait activée pour initier, avec la polymérase virale pUL54, la synthèse de l'ADN au cours de la réplication virale (Krosky, Back *et al.* 2003; Marschall, Freitag *et al.* 2003). L'étude de Marschall *et al.*, montre que la région de pUL97 impliquée dans l'interaction avec pUL44 se situe entre les acides aminés 366 et 459, ce qui correspond à la région comprenant les domaines II à VI (Marschall, Freitag *et al.* 2003). Cette même étude, suggère que le CDV, et deux indolocarbazoles (NGIGI-Gö6976) qui sont des inhibiteurs spécifiques de pUL97, inhibent la colocalisation de pUL97 et pUL44 au niveau nucléaire par un processus encore inconnu.

Plus récemment, Marschall *et al.* ont démontré l'interaction de pUL97 avec la protéine cellulaire p32 (Marschall, Marzi *et al.* 2005). Cette interaction aboutit à la phosphorylation de p32 par pUL97. La protéine p32 ainsi phosphorylée, constitue un complexe avec la protéine pUL97. La protéine p32 est capable de se fixer à de nombreuses protéines cellulaires dont la protéine LBR (lamin B receptor), un récepteur de la lamina. La constitution du complexe pUL97-p32 permet ainsi le transport et l'accumulation de pUL97 au niveau de la membrane nucléaire et de la lamina. La phosphotransférase pUL97, se trouvant à proximité des lamines B et C, catalyse alors leur phosphorylation, provoquant leur dépolymérisation et, par conséquent, la dislocation de la lamina. La phosphotransférase pUL97 contrôle ainsi l'exportation des capsides hors du noyau en déclenchant la dislocation de la lamina (Marschall, Marzi *et al.* 2005).

Cependant, la dislocation de la lamina seule ne suffit pas à permettre la sortie du noyau des capsides néoformées. Dans une étude récente, Prichard et coll., ont montré que l'activité kinase de pUL97 était indispensable à l'exportation extranucléaire des capsides, indépendamment de la protéine cellulaire p32 (Prichard, Britt *et al.* 2005). Dans cette étude, Prichard et coll. ont constaté que des souches recombinantes de CMV, portant une protéine pUL97 dépourvue de son activité kinase, présentaient un défaut de distribution des protéines du tégument et, en particulier, de pp65. Cette mauvaise distribution de pp65 se traduit par la présence d'agrégats dans le noyau qui a pour conséquence une tégumentation précoce,

intranucléaire, des capsides néoformées. La tégmentation est un processus généralement extranucléaire. Son déroulement à l'intérieur du noyau perturbe fortement l'exportation des capsides et retarde d'autant le cycle viral. Prichard et coll. ont établi que l'agrégation intranucléaire de pp65 était la conséquence d'un défaut de phosphorylation de cette protéine. Par ailleurs, au cours de cette même étude, ils ont montré que le maribavir inhibait l'activité kinase de pUL97 et que cette inhibition aboutissait à la formation d'agrégats intranucléaires de pp65. Ils ont ainsi démontré que l'absence de l'activité kinase de pUL97 était impliquée dans le défaut de phosphorylation de pp65 et donc dans la tégmentation précoce. L'une des fonctions naturelles de pUL97, est ainsi d'inhiber la tégmentation précoce intranucléaire des capsides par phosphorylation, directe ou au cours d'une cascade de phosphorylation, des phosphoprotéines pp65 présentes dans le noyau. Enfin, cette étude démontre que le maribavir cible spécifiquement cette étape importante du cycle par inhibition de l'activité kinase de pUL97.

La phosphotransférase pUL97 intervient ainsi dans la réplication virale à différents niveaux jouant en quelque sorte le rôle de chef d'orchestre de la réplication. Tout d'abord, elle déclenche l'initiation de la synthèse d'ADN viral, en phosphorylant la protéine accessoire pUL44. Puis, plus tard dans le cycle, elle favorise la sortie du noyau des capsides néoformés, d'une part en déclanchant, via la protéine cellulaire p32, la dislocation de la lamina, et d'autre part en inhibant la tégmentation intranucléaire, via la phosphorylation de pp65 (Figure 13). Ainsi, le rôle central de pUL97, à différents niveaux du cycle viral, explique-il l'expression précoce ou précoce-tardive du gène *UL97*.

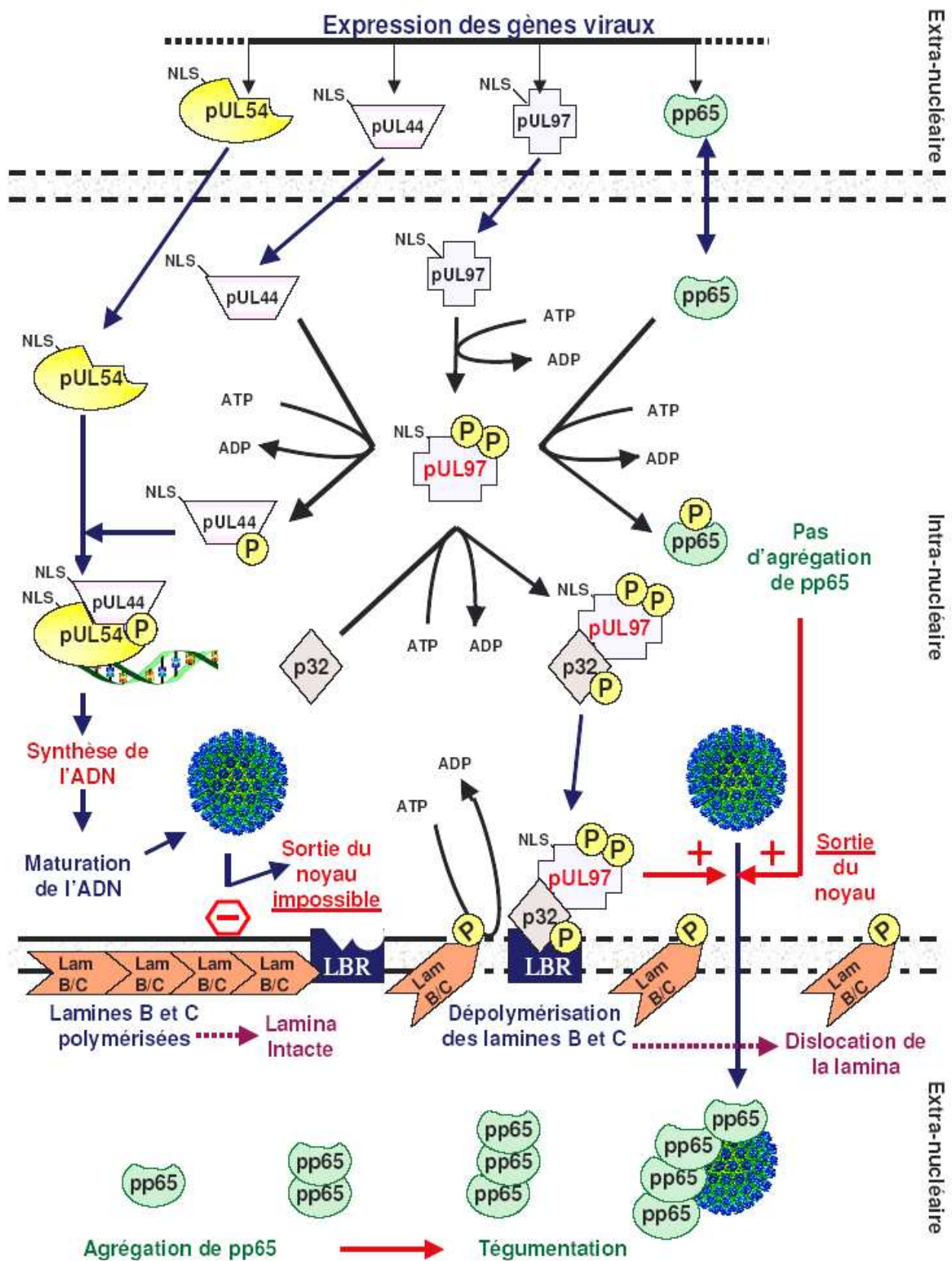


Figure 13 : Rôle central de pUL97 au cours du cycle viral : de la synthèse d'ADN à l'exportation extranucléaire des capsides néoformées

Figure 13 : Rôle central de pUL97 au cours du cycle viral : de la synthèse d'ADN à l'exportation extranucléaire des capsides néoformées

Après l'expression des gènes viraux les différentes protéines pourvues d'une région NLS (nuclear localisation signal) sont co-localisées dans le noyau des cellules après transport par la voie de l'importine- α cellulaire. L'autophosphorylation de la phosphotransférase pUL97 aboutit à son activation. La protéine pUL97 phosphorylée intervient alors à différents niveaux du cycle viral. pUL97 catalyse la phosphorylation de la protéine accessoire pUL44 agissant ainsi sur la synthèse de l'ADN viral qui peut alors être mûri puis encapsidé dans les capsides néoformées. Afin que les capsides puissent être exportées hors du noyau, pUL97 déclenche la dislocation de la lamina par phosphorylation de la protéine cellulaire p32. La protéine p32 ainsi phosphorylée se complexe à pUL97 permettant son accumulation au niveau de la lamina par fixation du complexe p32/pUL97 aux récepteurs LBR (Lamines B receptor). pUL97 catalyse alors la phosphorylation des lamines B et C (Lam B/C) qui sont les constituants de base de la lamina. Ceci provoque la dépolymérisation des lamines et par conséquent la dislocation de la lamina. Enfin, pUL97 inhibe l'agrégation de pp65 au niveau intranucléaire ce qui empêche que la tégumentation ne débute dans le noyau. Cette inhibition nécessite la phosphorylation de pp65 par un mécanisme impliquant, directement ou non, l'activité kinase de pUL97.

2. ADN polymérase pUL54

a) Généralités sur les polymérases et classification

Le mécanisme de répllication des acides nucléiques (ADN ou ARN) est très conservé pour l'ensemble des organismes eucaryotes ou procaryotes. Il s'appuie sur une grande diversité d'enzymes polymérases présentant de hauts degrés d'homologies de séquence, de structure et d'activité catalytique (Joyce and Steitz 1987). Deux grands modes de classification, s'appuyant sur différents critères, ont été établis. Le mode de classification le plus communément utilisé porte sur la nature des polymérases (ADN ou ARN polymérases), sur la nécessité de la présence d'une protéine accessoire, et sur les fonctions supplémentaires portées par l'enzyme : activité 3'-5' exonucléase (pour la plus part des ADN polymérases ADN-dépendantes), activité 5'-3' exonucléase (pour quelques polymérases bactériennes), ou activité RNAase H pour les transcriptases inverses. Les polymérases ont ainsi été classées en cinq superfamilles. Les deux premières familles de polymérases sont des ADN polymérases ADN-dépendantes : les ADN polymérases I ou Pol I-like polymérases (Pol I), et les α -like polymérases (polymérases α ou Pol α). La troisième famille correspond aux ADN polymérases β (ou pol β), tandis que les ADN polymérases III constituent une quatrième famille. Enfin, la dernière famille englobe les transcriptases inverses, les ARN polymérases

ARN-dépendantes et les télomérasés (Joyce and Steitz 1995). Le second mode de classification permet de classer les polymérasés en six grandes familles d'après leurs relations phylogéniques et en fonction des inhibiteurs qui ont permis leur mise en évidence : famille A ou DNA POL A (dont DNA Pol I d'*E. coli*), famille B ou DNA POL B (à laquelle appartiennent les DNA Pol α dont la DNA Pol II d'*E. coli* et pUL54), famille C ou POL C (dont la DNA Pol III d'*E. coli*), et enfin les familles D, X et Y qui sont moins représentées. L'étude des polymérasés sur des modèles eucaryotes a conduit à utiliser une troisième nomenclature en fonction de l'ordre de découverte des polymérasés cellulaires : ADN polymérasés α , ADN polymérasés β , ADN polymérasés γ , ADN polymérasés δ et ADN polymérasés ϵ (Voet and Voet 2004).

Les polymérasés des herpès virus sont des α -like polymérasés (polymérasés- α), appartenant elles-mêmes à la famille B, au même titre que les polymérasés du phage T4 (Gp43) et du phage RB69 (Gp43). La structure de la polymérase du bactériophage RB69 a été déterminée par cristallographie et analyse aux rayons X par Steitz en 1999 (Steitz 1999). L'enzyme est constituée de cinq domaines organisés autour d'une cavité centrale qui contient le site actif polymérasique (figure 14). Le domaine polymérasique de l'enzyme Gp43 de RB69 a grossièrement la forme d'une main droite avec différents sous-domaines constituant la paume ou palm domain, le pouce ou thumb domain, et les doigts ou fingers domain.

b) L'ADN polymérase pUL54 du CMVH

La polymérase pUL54 est une protéine de 1242 résidus acides aminés, soit 140 kDa, codée par un gène de 3729 pb localisé dans le segment unique long du CMVH. La séquence de référence a été décrite dès 1986 par Kouzarides et coll. (Kouzarides, Bankier *et al.* 1986). Le gène *UL54* comporte un fort degré d'homologie avec les gènes codant les polymérasés d'autres herpès virus, ou même avec l'ADN polymérase humaine, avec un taux d'homologie pouvant atteindre 24 % (jusqu'à 247 acides aminés invariants pour les polymérasés virales) (Larder, Kemp *et al.* 1987). Le gène *UL54* appartient à un groupe de gènes conservés constitué de dix gènes : *UL48* à *UL57*. Le gène *UL54* est transcrit en un seul ARN messenger de 4,7 kpb durant la phase précoce de la réplication virale (Kouzarides, Bankier *et al.* 1986).

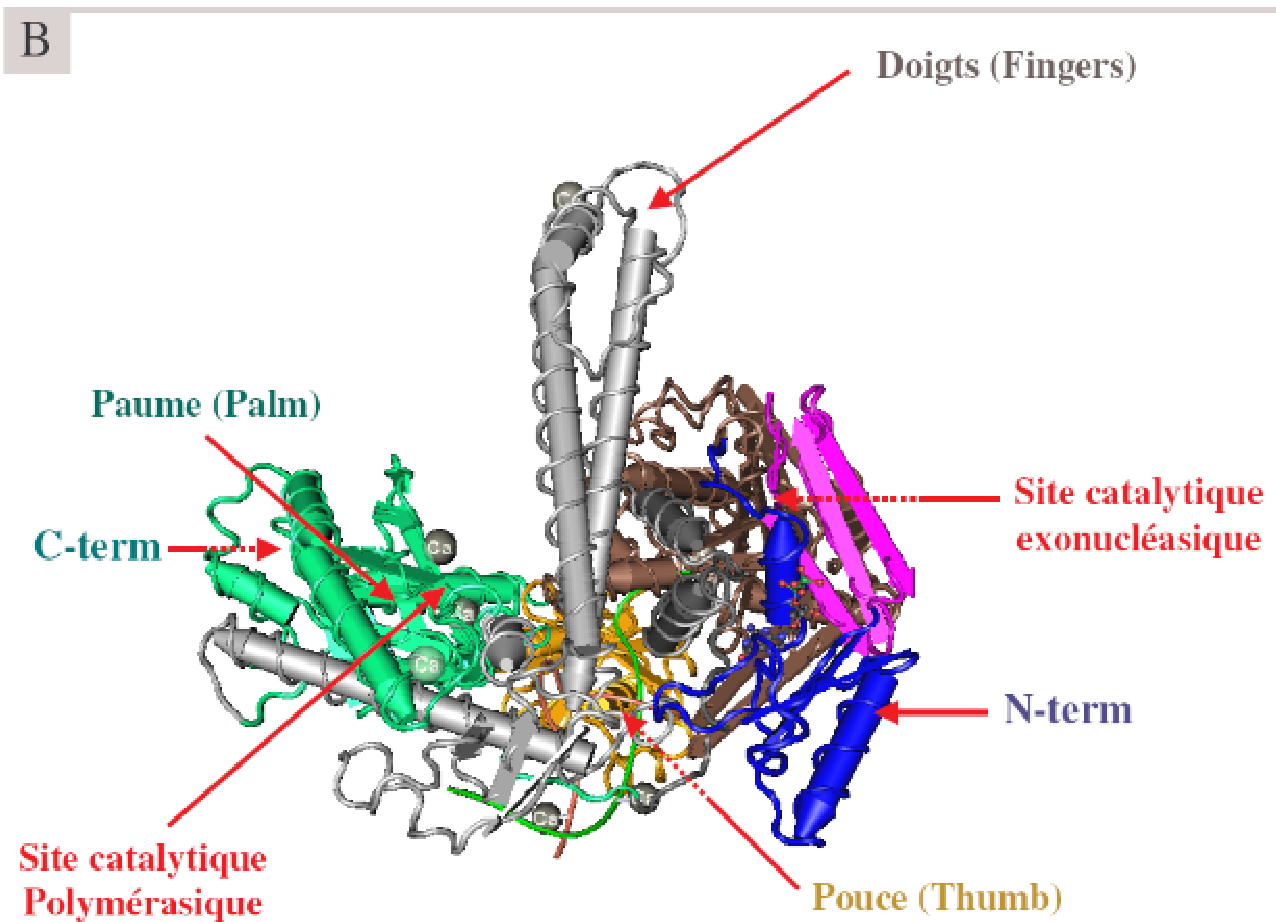
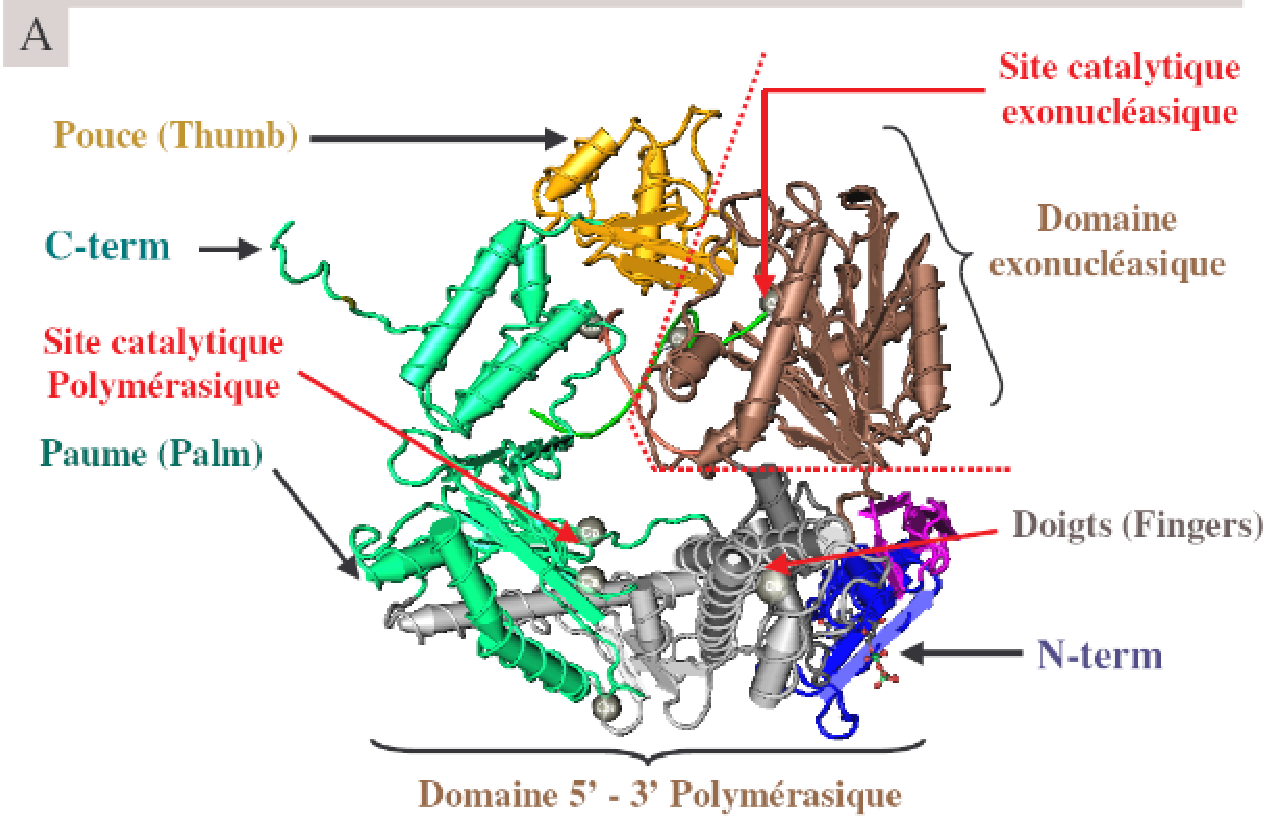


Figure 14 : Structure de l'ADN polymérase Gp43 du bactériophage RB69

Figure 14 : Structure de l'ADN polymérase Gp43 du bactériophage RB69

La protéine (PDB N° 1IG9) est représentée selon deux vues dans l'espace (A et B, correspondant à une rotation verticale de 90°) grâce au logiciel Cn3D (NCBI). Gp43 est représentée sous forme de rubans de couleurs différentes selon le domaine. Elle a grossièrement la forme d'une main droite dont la paume (en vert) porte le domaine catalytique ATPasique, le pouce (en jaune) intervient dans la processivité de l'enzyme, et les doigts (en gris) interviennent dans l'interaction avec les nucléotides. Les ions métalliques (Ca^{2+} , Mn^{2+} , Mg^{2+} , et Zn^{2+}) associés aux sites polymérasique et exonucléasique sont représentés par des boules grises. Les pointillés rouges séparent le domaine exonucléasique des domaines impliqués dans l'activité polymérasique.

A l'instar de la polymérase du phage T4 ou du phage RB69, la polymérase des herpès virus est une polymérase ADN-dépendante de la superfamille des α -polymérases (famille B). La structure de la polymérase pUL54 n'a toujours pas pu être décrite par cristallographie et par analyse aux rayons X. Cependant, la bonne conservation des séquences et des structures des polymérases en général, et des α -polymérases en particulier, permet d'appréhender la structure de pUL54 grâce à la connaissance de la structure de RB69 décrite figure 14 (Steitz 1999). Par ailleurs, l'analyse des alignements des séquences peptidiques des polymérases virales et de l' α -polymérase humaine a permis la description de huit régions conservées nommées régions conservées I à VII, en fonction de leur degré de conservation, et région δ -C, propre aux herpès virus (Kouzarides, Bankier *et al.* 1986; Larder, Kemp *et al.* 1987; Stanat, Reardon *et al.* 1991; Ye and Huang 1993). Ces régions, représentées figure 11, séparent la protéine en trois segments selon leur fonction au sein de la protéine. Le domaine exonucléasique de la protéine implique sa partie N-terminale (résidus 1 à 550 environ). L'activité polymérasique correspond à la partie centrale de la protéine (résidus 400 à 1000 environ). Enfin la partie C-terminale de la protéine (résidus 1100 à 1242 environ) intervient dans l'interaction avec la protéine accessoire pUL44.

❖ Activité 3'-5'exonucléasique

La plupart des ADN polymérases ADN-dépendantes possèdent une activité 3'-5'exonucléasique qui permet de réaliser la fonction dite de correction d'épreuves (*proofreading*). Cette fonction permet à l'enzyme de contrôler la séquence du brin d'ADN néoformé, au cours de sa synthèse, à la recherche d'éventuelles erreurs d'appariement. Si un mésappariement est détecté, l'enzyme utilise son activité 3'-5' exonucléasique pour exciser les nucléotides mal appariés. Cette fonction 3'-5' exonucléasique, mise en évidence sur le fragment de Klenow de la polymérase I d'*E. coli*, est portée par un domaine propre,

indépendant du domaine polymérasique, permettant à l'enzyme de vérifier le bon appariement du brin d'ADN néoformé simultanément à sa synthèse. D'un point de vue biochimique, il semblerait, qu'au cours de la réplication de l'ADN, un équilibre s'établisse entre les activités polymérasique et exonucléasique. La structure tridimensionnelle globale de la protéine permet la constitution d'un sillon et d'un tunnel à l'intérieur desquels se positionne l'ADN au cours de la réplication (Steitz 1999). Les erreurs de réplication se traduisent par un mésappariement des nucléotides entre le brin matrice et le brin néoformé. Ce mésappariement provoquerait une déstabilisation de la double hélice d'ADN se traduisant par un bouleversement de sa conformation qui déclencherait un changement conformationnel de la protéine. Ce dernier aboutirait à un pivotement du domaine exonucléasique permettant son rapprochement de l'extrémité 3' du brin néoformé et, par conséquent, l'excision des nucléotides mal appariés. Une fois les nucléotides mal appariés excisés, la double hélice d'ADN reprend une conformation stable permettant à la polymérase de retrouver sa conformation initiale. L'extrémité 3' du brin d'ADN néoformé se retrouve à nouveau à proximité du domaine polymérasique, et la synthèse d'ADN reprend son cours (Steitz 1999).

L'activité 3'-5' exonucléasique de pUL54 implique 3 régions conservées localisées dans la partie N-terminale de la protéine : région Exo I (entre les acides aminés 295 et 312), région Exo II (entre les acides aminés 404 et 418), et région Exo III (entre les acides aminés 533 et 545). Ces trois régions ont été identifiées à partir des homologies des structures primaires des polymérases eucaryotes et procaryotes (Bernard, Blanco *et al.* 1989).

La région Exo I porte une séquence consensus $_{379}\text{VXEFXSEXXXLXXF}_{392}$ conservée parmi les herpès virus. Ce domaine contient deux résidus très conservés chez les polymérases à activité 3'-5' exonucléasique : un glutamate (E385) impliqué dans la liaison aux ions métalliques (Zn^{2+} , Mg^{2+} , et Mn^{2+}) au niveau du site exonucléasique, et une leucine (L389) intervenant dans l'interaction avec les bases azotées de l'extrémité 3' du brin d'ADN néoformé.

La région Exo II est constituée du motif consensus $_{405}\text{TGYNXXXFD}_{413}$. Plusieurs acides aminés de ce motif sont très conservés parmi les polymérases à activité 3'-5' exonucléasique. Parmi ces acides aminés, les résidus asparagine, phénylalanine et aspartate (N408, F412 et D413) sont impliqués dans la liaison aux ions métalliques (Zn^{2+} , Mg^{2+} , et Mn^{2+}) et sont essentiels à l'activité nucléasique du domaine exonucléasique.

La région Exo III porte une séquence consensus $_{536}\text{GXYCXQDXXLV}_{546}$ conservée parmi les polymérases des herpès virus. Ce motif contient un résidu tyrosine et un résidu aspartate (Y538 et D542) très conservés parmi les polymérases à activité 3'-5' exonucléasique

(Derbyshire, Freemont *et al.* 1988; Freemont, Friedman *et al.* 1988; Bernard, Blanco *et al.* 1989).

❖ **Activité 5'-3' polymérasique**

L'activité polymérasique implique la région centrale de la protéine, entre les acides aminés 379 et 988. Cette région est connue comme étant le segment de pUL54 le plus riche en acides aminés conservés. Elle contient les régions IV (résidus 379 à 421), II (résidus 696 à 742), VI (résidus 771 à 790), III (résidus 805 à 845), I (résidus 905 à 919), VII (résidus 962 à 970) et V (résidus 978 à 988). L'analyse de la fonction de ces différentes régions au cours de la polymérisation a été réalisée chez l'herpes virus de type 1 à partir de souches recombinantes ou de mutants résistants aux antiviraux (Larder, Kemp *et al.* 1987; Dorsky and Crumacker 1988; Gibbs, Chiou *et al.* 1988). Ces études, doublées de l'analyse des séquences des ADN polymérasas de différentes familles, ont permis d'identifier plusieurs acides aminés impliqués dans l'activité polymérasique. Des études ultérieures ont permis de confirmer l'implication de ces acides aminés dans l'activité polymérasique et la conservation des structures tridimensionnelles des domaines dans lesquels ils sont situés (Joyce and Steitz 1995; Gardner and Jack 1999).

Tout d'abord, deux motifs très conservés, nommés motifs A et C, ont été mis en évidence. Le motif A, de séquence consensus DXXSLYPS, correspond au segment ₇₁₇DSASLYPS₇₂₄ chez pUL54. Il contient un résidu aspartate conservé (D717 pour pUL54) qui permet l'interaction avec le Mg²⁺ du complexe MgNTP (complexe Mg²⁺/nucléotide triphosphate). Le motif C porte la séquence consensus YGDTS, correspondant au segment ₉₀₈YGD₉₁₂ pour pUL54, et contenant un résidu aspartate (D₉₁₂ pour pUL54) impliqué dans la liaison au Mg²⁺ du complexe MgNTP (figure 15). Les motifs A et C sont localisés dans un ensemble de feuillets-β antiparallèles de la paume de la polymérase (Joyce and Steitz 1995; Gardner and Jack 1999).

Des acides aminés basiques conservés intervenant dans la réaction de polymérisation ont aussi été décrits. Ils sont localisés dans les hélices-α constituant les doigts de la polymérase. Il s'agit des arginines 784 et 788 et de la lysine 811 de pUL54 respectivement homologues des résidus R482, K486, et K560 de Gp43 du phage RB69 (Joyce and Steitz 1995; Gardner and Jack 1999). Une étude plus récente de Tchesnokov et coll. a montré que certains de ces acides aminés formant les doigts de la polymérase sont impliqués, non seulement dans la fixation de

nucléotides au cours de la polymérisation, mais aussi dans la fixation de certains analogues comme le CDV (Tchesnokov, Gilbert *et al.* 2006). Cette étude montre l'intérêt de la connaissance des bases biochimiques de la réaction de polymérisation dans la compréhension des processus de résistance aux antiviraux.

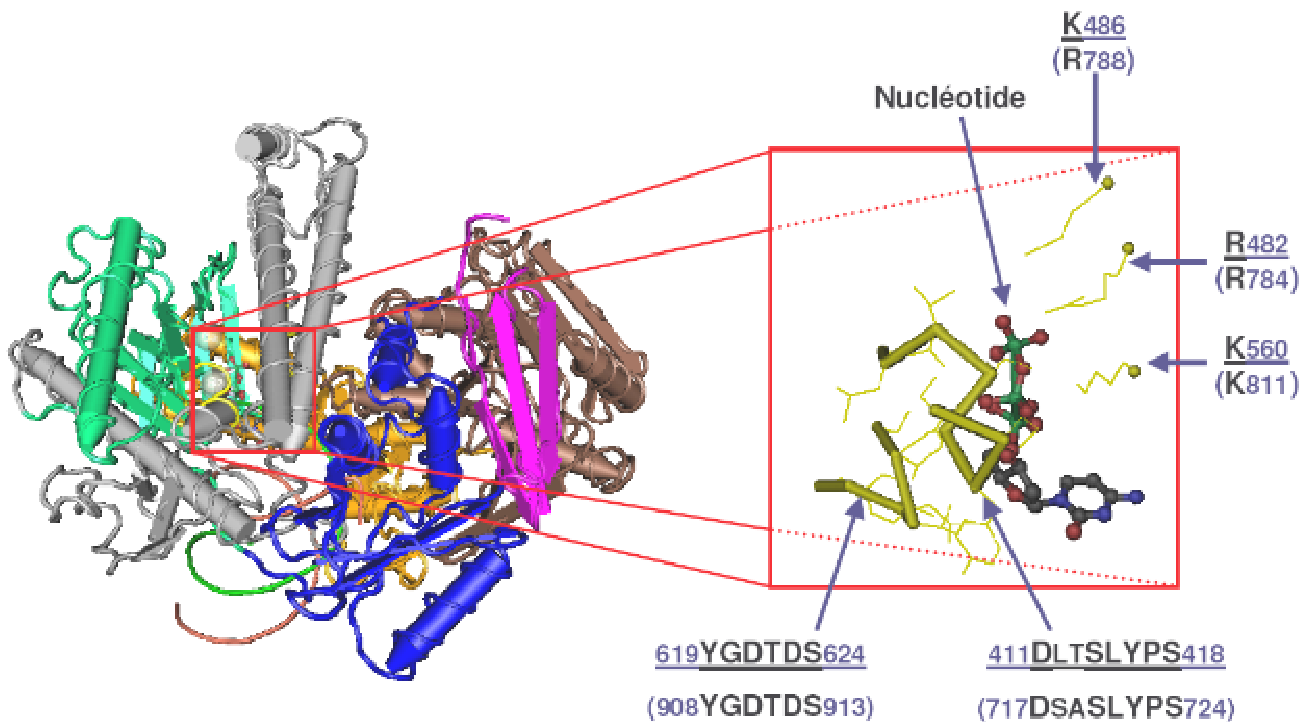


Figure 15 : Acides aminés impliqués dans la liaison aux nucléotides chez la polymérase Gp43 du phage RB69 et correspondance chez la polymérase pUL54 du CMVH

A gauche est représentée la polymérase Gp43 du phage RB69 (PDB N° 1IG9). Afin d'illustrer les résultats de Joyce et Steitz et de Gardner et coll., nous avons utilisé le programme Cn3D afin de présenter les acides aminés impliqués dans l'interaction avec les nucléotides (à droite en gros plan). Les nombres soulignés correspondent aux acides aminés chez Gp43 ; les nombres inscrits en dessous donnent les acides aminés homologues chez pUL54 du CMVH.

❖ Processivité de la polymérase et protéine accessoire pUL44

La processivité des ADN polymérases implique, outre la polymérase elle-même, d'autres éléments. Elle peut ainsi être améliorée soit par la fixation de facteurs de processivité sur l'ADN matriciel, soit par la stimulation de l'activité catalytique de l'ADN polymérase par une protéine accessoire. L'activité polymérasique de la plupart des ADN polymérases de la famille B nécessite ainsi l'intervention d'une protéine accessoire qui permet de stabiliser le complexe polymérase/ADN matriciel et, à ce titre, d'augmenter la processivité de l'enzyme (Kelman, Hurwitz *et al.* 1998). La protéine accessoire du cytomegalovirus humain est la

protéine pUL44. Le site de fixation à pUL44 est localisé à l'extrémité C-terminale de pUL54, entre les acides aminés 1221 et 1242. Il a été montré qu'un résidu isoleucine de pUL44 (I135) et les acides aminés localisés dans l'extrémité C-terminale de pUL54 étaient indispensables à l'interaction entre les deux protéines (Appleton, Brooks *et al.* 2005). Par ailleurs, Bridges et coll., ont démontré qu'un peptide de 22 acides aminés correspondant au segment de pUL54 situé entre les résidus 1221 et 1242 inhibait l'interaction des deux protéines (Bridges, Hua *et al.* 2000). Cette inhibition est probablement la conséquence d'une compétition dans la fixation de pUL54 et du polypeptide à pUL44.

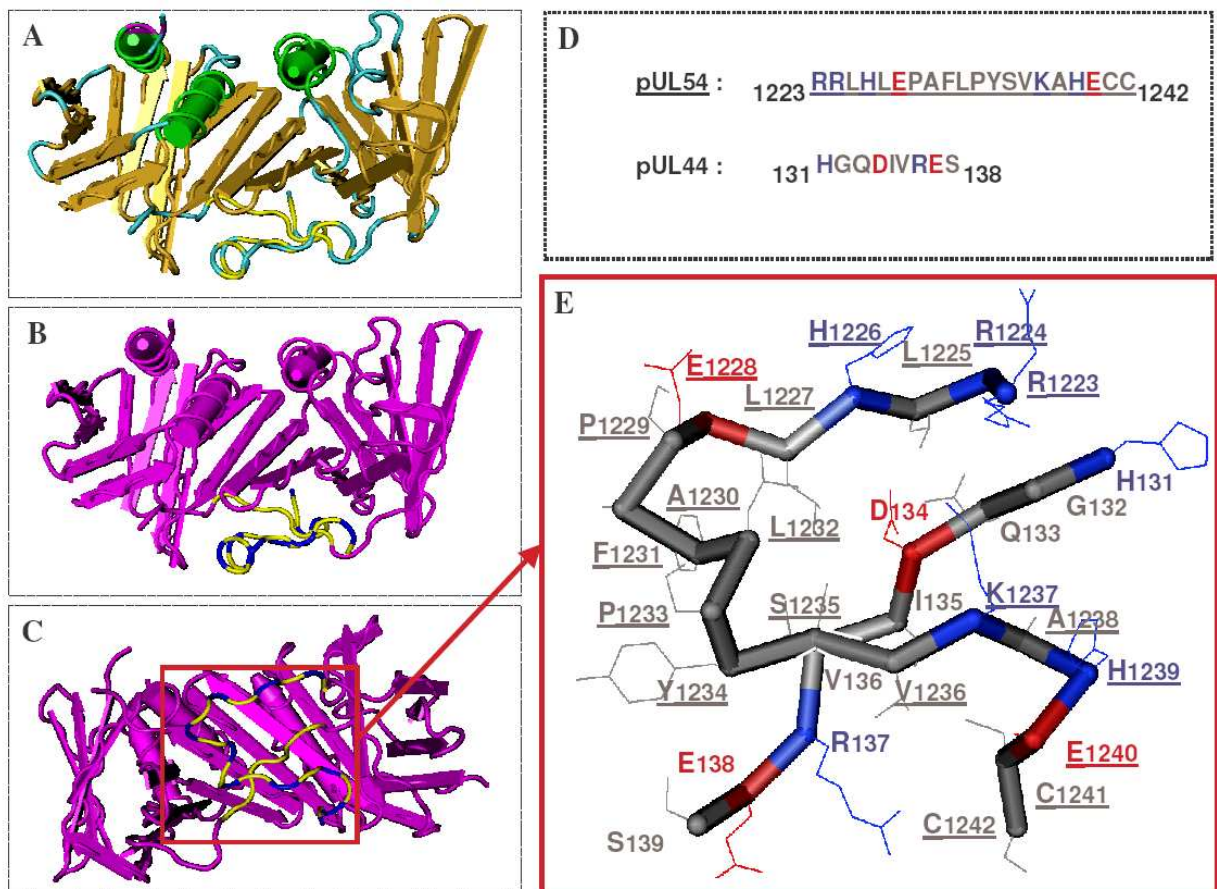


Figure 16 : Interaction entre la protéine accessoire pUL44 et le domaine C-terminal de la polymérase pUL54

Nous avons utilisé le programme Cn3D pour illustrer les résultats de Bridges et coll. A gauche sont figurées différentes représentations de la structure tridimensionnelle du complexe pUL44/domaine C-term de pUL54 (résidus 1223-1242) (PDB N° IYYP) ; **A** : structure globale de pUL44 montrant les hélices- α (en vert), les feuillettes- β (en doré), et les domaines de flexibilité (en bleu et jaune) ; **B** : sont représentés dans des couleurs différentes la protéine pUL44 (en violet) et son domaine d'interaction avec le domaine C-term de pUL54 (en jaune et bleu) ; **C** : représentation du domaine d'interaction entre pUL44 et le domaine C-term de pUL54 après une rotation de 90° dans l'espace par rapport à la représentation B ; **D** : acides aminés de pUL54 (résidus soulignés) et pUL44 impliqués dans l'interaction, le code couleur correspond à la charge de l'acide aminé : rouge = résidu acide, bleu = résidu

basique, et gris = résidu neutre (polaire ou apolaire) ; E : gros plan sur les acides aminés impliqués dans l'interaction entre les deux protéines : les résidus soulignés appartiennent à pUL54 tandis que les résidus issus de pUL44 ne sont pas soulignés.

La cocrystallisation et l'analyse aux rayons X de la protéine pUL44 et de ce peptide ont permis de mieux appréhender le mode d'interaction entre les deux protéines (figure 16). Cette analyse structurale confirme les résultats de l'étude de Bridges et coll., basée sur l'analyse du mode d'interaction entre pUL30 et pUL42 du HSV-1 (respectivement les homologues de pUL54 et pUL44 du CMVH), qui a montré que l'interaction entre les deux enzymes faisait intervenir une structure en boucle dite *connector-loop* (Bridges, Hua *et al.* 2000; Appleton, Brooks *et al.* 2005).

Enfin l'étude de Bridges et coll. suggère que le mécanisme d'interaction entre les deux protéines pourrait constituer une cible d'intérêt dans le cadre du développement d'inhibiteurs de la synthèse de l'ADN viral (Bridges, Hua *et al.* 2000).

3. Protéine d'encapsidation pUL56

La protéine pUL56 est un polypeptide de 850 acides aminés (110 kDa environ) codé par un gène de 2553 pb localisé dans le fragment unique long du génome du cytomégalo virus. Elle est l'homologue de l'ORF ICP 18.5 de l'herpès virus de type 1 (pUL28). La protéine pUL56 est transcrite lors de la phase tardive de la réplication (Batadaram, Dabrowski *et al.* 1994), cependant elle peut être détectée dans les cellules infectées moins de 24 heures après l'infection (Smuda, Bogner *et al.* 1997), certainement du fait de sa présence dans le tégument des virions (Pass 2004). Il a été démontré que, durant la phase tardive du cycle de réplication, la protéine se retrouvait, de façon prédominante, colocalisée avec le complexe ppUL112-ppUL113, dans les centres de réplication, au même titre que pUL44. La co-localisation de pUL56 et de ces protéines connues pour être impliquées dans la synthèse et la maturation de l'ADN a suggéré son intervention dans ces processus (Giesen, Radsak *et al.* 2000). Par ailleurs, pUL56, aussi nommée petite sous-unité du complexe terminase, par homologie avec les bactériophages, forme avec les autres terminases (pUL51, pUL52, pUL77 et pUL89) des complexes hétéro-oligomériques intervenant dans le clivage et l'encapsidation de l'ADN viral (Bogner, Radsak *et al.* 1998).

D'un point de vue structural, la protéine pUL56 porte dans sa région C-terminale une région NLS qui permet l'interaction avec l'importine- α cellulaire et par conséquent le transit

de la protéine au niveau intranucléaire. Au sein de ce segment riche en acides aminés basiques $_{816}\text{RRVRATRKRPRR}_{827}$, seuls deux acides aminés, R822 et K823, sont indispensables à la localisation intranucléaire de pUL56 (Giesen, Radsak *et al.* 2000). En 2002, Bogner relate l'existence d'un potentiel motif "*leucine zipper*" (motif en fermeture éclair à leucine) dans l'extrémité C-terminale de la protéine entre les leucines 726 et 758 (Bogner 2002). De telles structures, riches en résidus leucine, sont impliquées dans des processus d'interaction protéine/protéine ou permettent des repliements internes au sein d'une protéine en permettant à deux domaines protéiques d'interagir et de se fixer à la manière d'une fermeture éclair (d'où leur nom).

Peu de données sont disponibles quant aux fonctions des différents domaines de la protéine. En 1998, Krosky et coll. ont suggéré l'existence, dans la partie N-terminale de pUL56, d'un segment, entre les résidus 90 et 219, dont la séquence pourrait correspondre à un motif en doigt de zinc (Krosky, Underwood *et al.* 1998). De telles structures sont connues comme étant des domaines protéiques impliqués dans des processus d'interaction protéine/acides nucléiques, et plus particulièrement protéine/ADN. Le site de résistance au BDCRB et au TCRB, décrit en 1998 par Krosky et coll., correspondant à la substitution Q204R, est localisé dans ce domaine, suggérant un rôle de ce dernier dans le mécanisme d'action de ces molécules (Krosky, Underwood *et al.* 1998).

La partie C-terminale semble jouer un rôle important dans l'encapsidation puisqu'une étude de 2001 a montré qu'elle portait, *in vitro*, une activité ATPasique (Hwang and Bogner 2002). L'activité ATPasique s'appuie sur des segments d'acides aminés dont la séquence correspond partiellement à des boîtes de Walker (cf. Paragraphe-IV-4). Ces séquences correspondent aux motifs $_{709}\text{YNETFGKQ}_{716}$ et $_{463}\text{RARGGGKK}_{470}$ et contiennent deux acides aminés critiques pour l'activité ATPasique de pUL56 *in vitro*, G714 and K715 (Scholz, Rechter *et al.* 2003). Les autres motifs de l'ATPase motor, pourtant indispensables à cette activité ATPasique, n'ont pas pu être identifiés sur pUL56 et ses homologues chez les herpèsvirus. Par ailleurs, les résultats de Hwang et Bogner ont montré que la partie C-terminale de pUL56 se fixait à pUL89 et que la présence de pUL89 augmentait sensiblement l'activité ATPasique de pUL56 (Hwang and Bogner 2002).

L'analyse par mutagenèse, de la capacité de pUL56 à se fixer aux séquences *pac* a révélé que deux courtes séquences, riches en bases A et T, suffisaient à la fixation spécifique de pUL56 : les séquences *pac1* (5'TAAAAA3') et *pac2* (5'TTTTAT3'). La capacité de pUL56 à se complexer aux séquences *pac1* et *pac2* est indépendante de l'hydrolyse de l'ATP. Enfin, cette étude a révélé que pUL56 avait la capacité de cliver des plasmides contenant des

séquences *a* (séquences contenant les séquences *pac*) et qu'elle portait donc une activité endonucléasique spécifique (Bogner, Radsak *et al.* 1998).

Plus récemment, une étude de Bogner, basée sur l'observation de pUL56 au microscope électronique, a montré que la protéine présentait, au niveau structural, des caractéristiques de protéines impliquées dans le métabolisme de l'ADN (Bogner 2002). Cette étude montre que pUL56 peut se présenter sous forme toroïdale ou sous forme d'une pince présentant plusieurs sillons pouvant permettre l'interaction avec l'ADN. Cette étude n'a toutefois pas permis d'élucider la structure exacte de la protéine et en particulier Bogner n'a pas réussi à déterminer si les différentes structures observées correspondaient à des conformations différentes de la protéine ou à différentes vues de celle-ci, ce qui l'a conduit à poursuivre ses investigations. Les résultats de ces travaux, publiés en 2004, ont permis de montrer que pUL56 existait sous forme de dimères. Le complexe constitué par deux pUL56s a été observé au microscope électronique et analysé par informatique en présence ou en absence d'ADN contenant les séquences *pac*. Cette étude confirme l'existence des structures toroïdales et des structures en forme de pince mais montre que ces dernières correspondent à un dimère de pUL56 et qu'elles sont dépendantes de la présence d'ADN contenant les séquences *pac* (Savva, Holzenburg *et al.* 2004). Enfin cette étude a permis l'élaboration d'un modèle théorique de la structure tridimensionnelle du dimère de pUL56s, présenté figure 17.

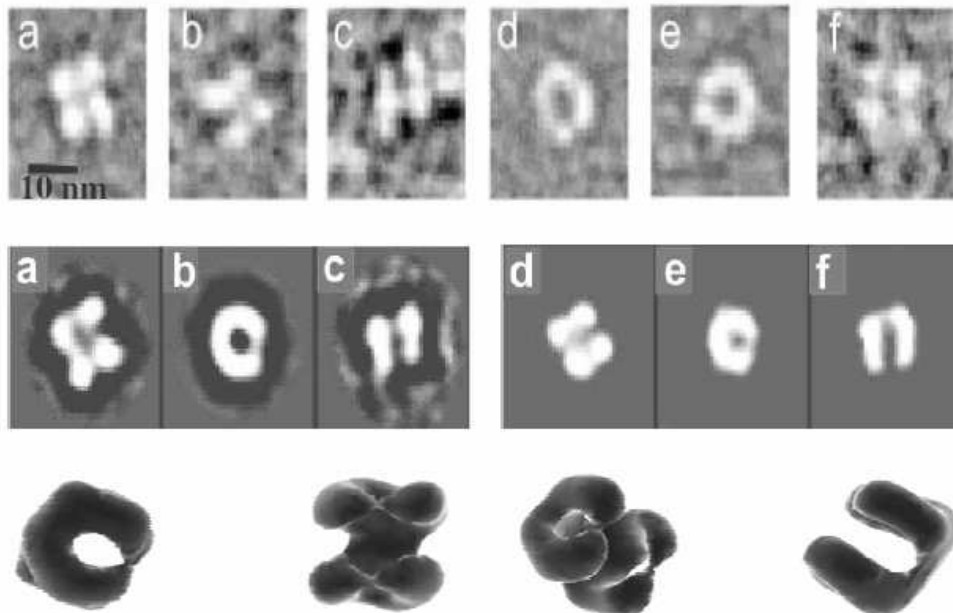


Figure 17 : Structure tridimensionnelle théorique du dimère de pUL56s

L'observation du dimère de pUL56s au microscope électronique selon différents angles (a à f) et le traitement informatique des données ont permis d'élaborer un modèle théorique de sa structure tridimensionnelle. Selon les angles d'observation, le dimère pUL56/pUL56 se

présente sous forme d'anneaux (forme toroïdale), sous forme de pinces, ou sous forme de U. L'ensemble de ces structures forme des sillons et des canaux permettant l'interaction à l'ADN (Savva, Holzenburg et al. 2004).

Ainsi, il semblerait que la capacité de pUL56 à se lier spécifiquement aux séquences *pac* et à cliver spécifiquement l'ADN au niveau des séquences *a* soit directement liée à la structure complexe du dimère. La fixation du dimère pUL56s aux séquences *pac* provoquerait un changement conformationnel qui permettrait d'une part, la fixation du complexe pUL56s/ADN à pUL89 et d'autre part, déclencherait l'activité endonucléasique de pUL56 permettant le clivage de l'ADN au niveau des séquences *a* (Bogner, Radsak *et al.* 1998; Savva, Holzenburg *et al.* 2004).

4. Protéine d'encapsulation pUL89

La protéine d'encapsulation pUL89, aussi nommée grande sous-unité du complexe terminase par homologie avec les bactériophages, est un polypeptide de 674 acides aminés (environ 75 kDa). Cette protéine est codée par un gène situé dans le segment unique long du CMV. Le gène *UL89* est l'homologue du gène *UL15* de l'herpèsvirus de type 1. Il est constitué de 2 exons de 888 pb et 1137 pb séparés par un intron de 3901 pb.

Il a été montré que pUL89 était l'homologue de la protéine gp17 (large sous-unité du complexe terminase) du bactériophage T4 (Davison 1992). Cette protéine intervient dans la translocation ATP dépendante de l'ADN dans les capsides néoformées. Il a en effet été montré que gp17 comportait différents domaines connus pour constituer le site catalytique de l'activité ATPasique, plus communément nommé ATPase motor (Mitchell, Matsuzaki *et al.* 2002). Par alignement de la séquence protéique de gp17 avec celles de nombreuses protéines à activité ATPasique, dont la grande sous-unité du complexe terminase des herpèsvirus, Mitchell et coll. ont identifié les trois principaux domaines formant l'ATPase motor.

Les deux premiers domaines, décrits dès 1982, sont communs à toutes les protéines portant une activité ATPasique. Il s'agit des boîtes de Walker A et B aussi nommées motifs I et II (Walker, Saraste *et al.* 1982). La boîte de Walker A arbore une séquence consensus G/AX₄GKT/S, ₂₀₉VFLVPRRGKTW₂₂₀ pour pUL89. Cette séquence contient un résidu arginine invariant qui permet l'interaction avec le groupement γ -phosphate du complexe Mg²⁺ATP et qui catalyse l'hydrolyse de l'ATP avec une autre arginine localisée dans la petite sous-unité du complexe terminase (gp16 pour le phage T4). Cette seconde arginine n'a pas été

identifiée chez les herpesvirus. La boîte de Walker B est généralement constituée d'une séquence consensus Z₃DE, où Z est un acide aminé hydrophobe, :₃₀₅LLLVD_{E310} pour pUL89. Elle est généralement localisée 50 à 130 résidus en amont de la lysine N-terminale de la boîte de Walker A. Il a été montré chez gp17 que cette boîte de Walker B contenait un résidu aspartate impliqué dans l'activité ATPasique. Le troisième domaine est le Motif III qui est habituellement constitué d'une séquence consensus S/T-S/T-S/T, ₄₄₁SST₄₄₃ pour pUL89. Le motif III est généralement localisé 27 à 30 résidus en amont de l'aspartate de la boîte de Walker B (Mitchell, Matsuzaki *et al.* 2002).

Les travaux de Mitchell et coll. ont ainsi permis de mieux appréhender la fonction de gp17. Malgré l'identification, au sein des terminases des herpesvirus, des régions homologues des domaines formant l'ATPase center, aucune étude ultérieure n'a été conduite pour analyser la fonction réelle de pUL89 au cours de l'encapsidation. Toutefois, les travaux de Bogner montrent que pUL89 seule ne porte pas, *in vitro*, d'activité ATPasique (Bogner 2002), ce qui est en accord avec les observations de Mitchell et coll., quant à la nécessité de la présence d'un autre partenaire protéique qui fournit la seconde arginine catalytique.

Par ailleurs, un site de résistance au BDCRB et au TCRB a été décrit au sein de pUL89, la substitution D344E suggérant le rôle de la protéine dans le mécanisme d'action de cette classe de molécule (Krosky, Underwood *et al.* 1998).

5. Protéine portail pUL104

La protéine pUL104 est un polypeptide de 697 résidus (environ 75 kDa) codé par un gène de 2094 pb localisé dans le segment unique long du génome.

La structure de pUL104 n'est pas encore connue, mais peut être abordée par comparaison avec la structure tridimensionnelle théorique de pUL6, l'homologue de pUL104 chez l'herpès virus de type 1, puisqu'il a été démontré que la protéine portail de la capsid était conservée à travers les herpesvirus (Newcomb, Juhas *et al.* 2001).

En 2001, la structure des complexes constitués par la protéine pUL6 a été caractérisée en microscopie électronique par Newcomb et coll. (Newcomb, Juhas *et al.* 2001). Après purification de la protéine pUL6, l'analyse des extraits au microscope électronique a permis de mettre en évidence la présence de structures toroïdales très uniformes (figure 18). Ces structures toroïdales correspondent en fait à des oligomères de pUL6 constitués par un agencement de plusieurs sous-unités de la protéine autour d'un canal central de 2 à 5 nm de

diamètre. Ces structures ont une configuration toroïdale de 16 à 18 nm de diamètre lorsqu'elles sont observées par le haut et une forme en Y de 14 à 17 nm de longueur lorsqu'elles sont observées latéralement (Newcomb, Juhas *et al.* 2001). Une étude récente de la même équipe a montré que les portails (oligomères de pUL6) étaient incorporés entre les protéines majeures de capsid, dès l'étape d'assemblage de celle-ci. Il a par ailleurs été montré que l'incorporation des portails n'intervenait qu'au moment de l'initiation de l'assemblage, mais que leur présence n'était pas indispensable à cette étape (Newcomb, Homa *et al.* 2005).

Une analyse équivalente des structures constituées par des complexes oligomériques de pUL104 a confirmé l'existence de ces structures toroïdales de taille équivalente chez le cytomégalo virus (figure 19) (Dittmer and Bogner 2005). Cette étude a montré que, outre les structures oligomériques qui constituent la forme prédominante, pUL104 pouvait aussi se présenter sous forme dimérique et rarement sous forme monomérique.

Enfin, dans cette même étude, une analyse *in vitro* a révélé que, à l'instar de nombreuses protéines impliquées dans l'encapsidation de l'ADN, pUL104 avait la capacité de fixer l'ADN double brin.

Récemment, une étude de Dittmer *et al.* a montré que pUL104 était colocalisée au niveau intranucléaire avec pUL56. D'autre part, cette même étude a démontré la capacité de pUL104 à se lier à l'extrémité C-terminale de pUL56. L'interaction entre les deux protéines semble être la cible des dérivés benzimidazolés dextrogyres (BDCRB, TCRB, et CL₄RB) (Dittmer, Drach *et al.* 2005). Une étude ultérieure avait révélé, par transfert de marqueur, que la mutation L21F de pUL104 était associée à la levée de la résistance induite par les mutations Q204R de pUL56 et D344E de pUL89, confirmant que les dérivés benzimidazolés ciblaient un complexe protéique au moins constitué de pUL56, pUL89 et pUL104 (Komazin, Townsend *et al.* 2004).

L'aptitude de pUL104 à former des structures oligomériques toroïdales et à lier l'ADN et la petite sous-unité du complexe terminase est en accord avec les connaissances acquises concernant les autres protéines portail virales. Elles s'organisent toutes autour d'un canal central à travers lequel la translocation de l'ADN est réalisée après son transport et son clivage par les protéines d'encapsidation (Newcomb, Juhas *et al.* 2001).

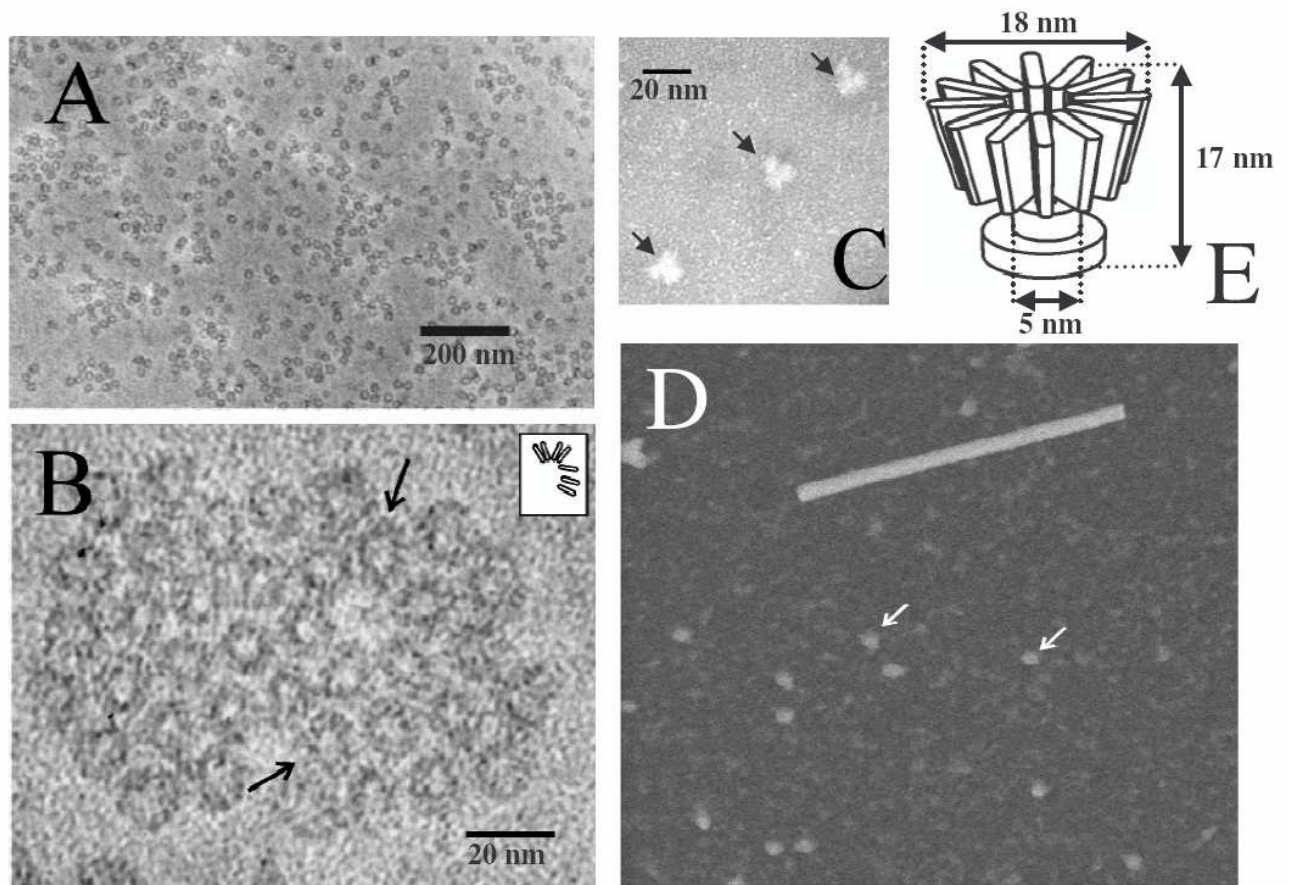


Figure 18 : Structure tridimensionnelle de la protéine portail pUL6 de l'herpès virus de type 1. D'après Newcomb et coll. (Newcomb, Juhas et al. 2001)

L'analyse de la structure de pUL6 au microscope électronique permet de mieux appréhender sa structure et montre que l'organisation du complexe de pUL6s permet la constitution d'un "portail" au niveau de la capside. A faible grossissement, le complexe présente une forme toroïdale (A). A plus fort grossissement (B), les anneaux indiqués par les flèches semblent constitués de plusieurs sous-unités organisées autour d'un axe, comme schématisé dans l'encadré. L'observation de ces structures suivant un angle différent montre qu'elles se présentent sous forme de Y indiquée par les flèches (C). L'application d'une technique de purification de pUL6 différente confirme la présence de structures oligomériques de forme toroïdale de 18 nm de diamètre indiquées par les flèches (D). Ces données ont été compilées pour construire un modèle théorique de la structure du complexe formant le portail de la capside (E). Les sous-unités de pUL6 s'organisent autour d'un axe pour constituer un canal central, d'où la forme toroïdale observée à faible grossissement.

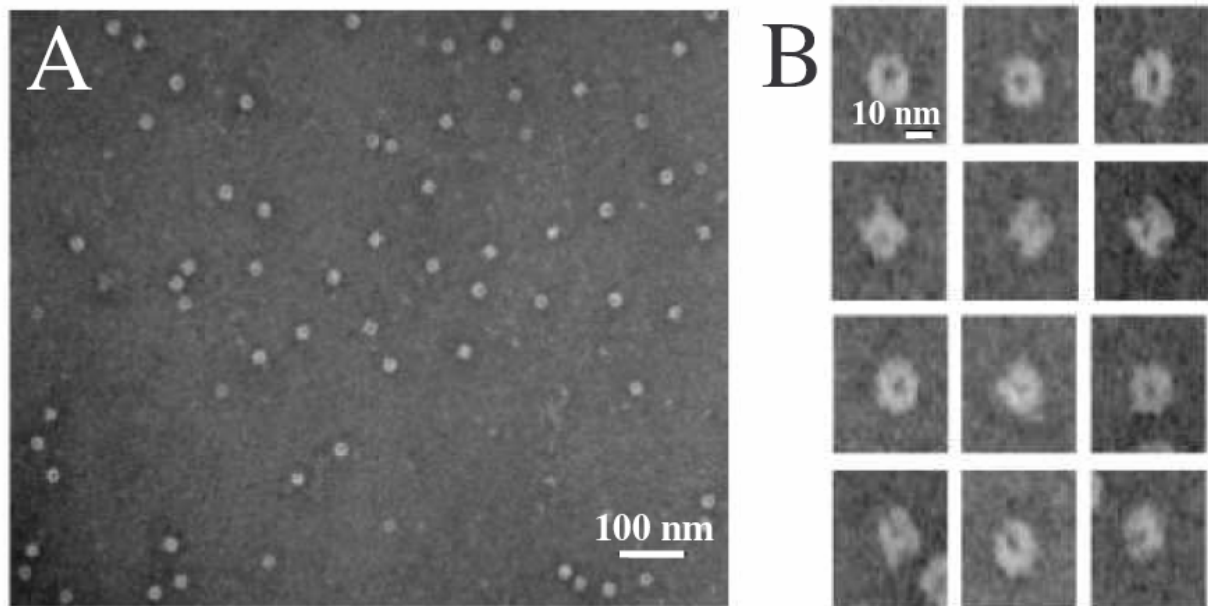


Figure 19 : Observation au microscope électronique des oligomères formés par la protéine pUL104 du cytomégalovirus. D'après Dittmer et coll. (Dittmer and Bogner 2005)

L'analyse au microscope électronique des complexes formés, *in vitro*, par pUL104 montre l'existence de structures similaires à celles constituées par son homologue pUL6 chez HHV-1. Les oligomères formés par pUL104, observés à faible (A) ou à fort (B) grossissement, ont une forme toroïdale délimitant un canal central de 15 à 20 nm de diamètre.

6. Protéine pUL27

La protéine pUL27 est un polypeptide de 608 acides aminés codé par un gène de 1827 pb localisé dans le fragment unique long du génome du cytomégalovirus. Très peu de données sont disponibles quant à la fonction et à la structure de cette protéine.

L'analyse du transcriptome des cytomégalovirus humains et murins par microréseaux d'ADN a montré que le gène *UL27* s'exprimait durant la phase précoce du cycle viral (Chambers, Angulo *et al.* 1999).

La glycoprotéine gpUL27 jouerait un rôle de récepteur impliqué dans la modulation des effets des interférons de type I et II, participant ainsi au contrôle de la réponse immunitaire (Gandhi and Khanna 2004) mais aucune étude n'a confirmé cette donnée.

Enfin, récemment, l'analyse de souches de laboratoire résistantes au maribavir a permis de décrire des mutations associées à la résistance au sein du gène *UL27* suggérant le rôle de pUL27 dans le mécanisme d'action de cette classe de molécules (Komazin, Ptak *et al.* 2003). En 2003, Komazin et coll. ont en effet décrit une substitution, L335P, associée, *in vitro*, à une

résistance au maribavir (Komazin, Ptak *et al.* 2003). Cette étude a mis en évidence la première mutation de résistance à un antiviral décrite au sein du gène *UL27*. Elle a conduit l'équipe de Chou et coll. à sélectionner des souches résistantes au maribavir par culture sous pression de sélection. Ces travaux ont permis la description de quatre nouvelles mutations conférant une résistance au MBV : trois substitutions R233S, W362R, et A406V, et une délétion de la partie C-terminale de pUL27 correspondant au tiers de la protéine et résultant de l'insertion d'un codon stop en position 415 (Chou, Marousek *et al.* 2004).

Il est admis que le maribavir cible l'étape d'exportation extranucléaire des capsides néoformées en inhibant spécifiquement l'activité kinase de pUL97 (cf. paragraphe-IV-1) mais la présence de mutations de résistance au MBV sur pUL27 suggère l'implication de la protéine dans ce mécanisme (Krosky, Back *et al.* 2003; Prichard, Britt *et al.* 2005). Ceci a conduit l'équipe de Krosky et coll. à suggérer que pUL27 intervenait directement dans ce mécanisme et qu'elle constituait un substrat potentiel de pUL97. Cependant, une étude récente de Prichard et coll. a révélé que pUL27 n'était pas nécessaire à la réplication du cytomégalovirus (Prichard, Quenelle *et al.* 2006) suggérant que son implication dans l'exportation extranucléaire des capsides n'était pas aussi directe que le pensait Krosky et coll. en 2003.

Par ailleurs, en 2000, les travaux de Montague et Hutchinson ont révélé que pUL27 était étrangement proche de pUL97 avec 12 % d'identité au niveau de la séquence en acides aminés (Montague and Hutchinson 2000). La signification physiologique de cette proximité n'a pas été élucidée.

Ces quelques données suggèrent l'intervention de pUL27 au niveau de différentes étapes de la réplication du cytomégalovirus : lors de l'infection elle-même, pUL27 serait impliquée dans la régulation de la réponse immunitaire puis, lors de la réplication, elle interviendrait par un processus encore inconnu dans l'exportation extranucléaire des capsides néoformées.

Objectifs de l'étude

Objectifs

Partant du postulat qu'il n'existe aucune technique standardisée d'étude et de détection des souches de cytomégalovirus résistantes aux antiviraux, nous nous sommes fixés comme objectif de développer des méthodes simples, fiables et standardisables de détection des résistances aux antiviraux actuels mais aussi aux molécules en développement. Les techniques développées seront mises à profit pour étudier la conservation intra-espèces des gènes impliqués dans les processus de résistance, en collaboration avec plusieurs centres hospitaliers ; le but étant de réaliser des études rétrospectives et prospectives de souches issues de prélèvements cliniques, afin d'identifier les polymorphismes et de recenser les résistances aux antiviraux actuels dans différentes situations cliniques. Les méthodes de séquençage des gènes codant les protéines cibles des antiviraux en développement seront utilisées pour réaliser des études préliminaires du polymorphisme naturel de ces protéines. Pour chaque cible, l'étude du polymorphisme sera doublée d'une analyse approfondie de la séquence primaire et de la conservation inter-espèces, permettant l'identification des domaines conservés, dans l'objectif d'améliorer la compréhension de leur fonction, du mode d'action des molécules qui les ciblent et de permettre, à terme, le développement de nouvelles molécules.

Déroulement de l'étude expérimentale

L'ensemble de notre travail s'appuie sur des isolats ou des prélèvements cliniques issus de plusieurs laboratoires en France. Le statut phénotypique de tous les isolats cliniques a été préalablement caractérisé dans notre laboratoire ou dans celui de Lariboisière. A cet effet, le phénotype de résistance aux trois antiviraux actuels, GCV, CDV et PFA, a été testé selon la méthode consensus développée par le groupe CMV AC11 de l'ANRS.

- Un premier axe de travail a porté sur les gènes cibles des inhibiteurs de la synthèse d'ADN viral : *UL97* et *UL54*.
 - Dans une première partie du travail nous nous sommes intéressés au gène *UL97*.

Nous avons mis au point des méthodes standardisées de génotypage du gène *UL97* destinées à l'analyse du polymorphisme naturel de pUL97 et à la détection des mutations de résistance au ganciclovir. Nous avons, par la suite, appliqué ces techniques à différentes études afin de les tester et de les valider.

Une première étude, réalisée en collaboration avec le service de Virologie de l'Hôpital Lariboisière et l'Institut de Microbiologie et d'Immunologie de l'Université de Ulm, avait pour objectif, d'une part, de réaliser une analyse rétrospective et comparative de la séquence du gène *UL97*, selon deux méthodes, sur des souches issues d'une cohorte de patients, et d'autre part, de construire un modèle théorique du site actif portant l'activité kinase en vue de l'étude des mutations potentiellement associées à une perte de l'activité kinase de la protéine : ce travail fait l'objet d'une publication soumise au "*Journal of Virological Methods*".

Une seconde étude multicentrique, réalisée en collaboration avec plusieurs centres hospitaliers, avait pour objectif d'évaluer l'émergence de souches portant des mutations de résistance au GCV après prophylaxie au valaciclovir chez des receveurs d'allogreffe de rein : ce travail a fait l'objet d'une publication parue dans "*Journal of Medical Virology*".

Une troisième étude, réalisée en collaboration avec l'Institut de Microbiologie et d'Immunologie de l'Université de Ulm, visait à analyser l'activité kinase de la phosphotransférase pUL97 portant une mutation détectée après instauration d'une prophylaxie avec du valaciclovir et d'un traitement de courte durée avec ganciclovir : ce travail a été publié dans "*Antimicrobial Agents and Chemotherapy*".

- Dans une deuxième partie du travail, nous nous sommes intéressés au gène *UL54*. Nous avons tout d'abord développé une méthode de génotypage de *UL54*, sur le modèle de *UL97* puis, après l'avoir testée et validée, nous l'avons utilisée pour étudier le polymorphisme naturel de pUL54 et détecter des mutations de résistance dans les isolats cliniques. Dans un deuxième temps, afin de compléter cette étude, nous avons construit des modèles structuraux des sites catalytiques polymérasique et endonucléasique destinés à analyser les relations structure/fonction de la polymérase. Ces modèles seront utilisés pour évaluer l'impact de nouvelles mutations sur la résistance et sur l'activité polymérasique.

Nous avons appliqué ces outils à l'étude de l'activité enzymatique et de la sensibilité aux antiviraux de la polymérase pUL54 faisant l'objet d'une autre thèse d'Université (Alexandra Ducancelle, 2004).

Une première étude, réalisée en collaboration avec plusieurs centres hospitaliers, avait pour objectif d'analyser le polymorphisme naturel du gène *UL54* : ce travail a fait l'objet d'une publication parue dans "*Antimicrobial Agents and Chemotherapy*".

Une deuxième étude, réalisée en collaboration avec les mêmes équipes, avait pour objectif l'analyse du génotype et du phénotype de résistance de souches séquentielles issus de patients infectés par le VIH traités par ganciclovir et par foscarnet pour traiter des atteintes neurologiques dues au CMV : ce travail fait l'objet d'une publication en préparation pour "*Journal of Clinical Virology*".

Une troisième étude avait pour objectif de développer et de valider une technique destinée à mesurer l'impact des mutations du gène *UL54* sur l'activité polymérasique. Notre contribution à cette étude portait sur la construction de modèles théoriques de la structure des sites catalytiques de la polymérase, destinés à l'évaluation de nouvelles mutations localisées dans, ou à proximité, des domaines fonctionnels : ce travail fait l'objet d'une publication en préparation pour "*Journal of Virological Methods*".

Une quatrième étude, réalisée en collaboration avec les services de Virologie de l'Hôpital Lariboisière et de l'hôpital de la Pitié-Salpêtrière, avait pour but d'évaluer l'impact d'une mutation de la polymérase (N495K) sur la capacité répliquative et sur la résistance au ganciclovir, au cidofovir et au foscarnet : ce travail fait l'objet d'une publication acceptée dans "*Antiviral Therapy*".

- Dans le deuxième axe du travail, nous avons utilisé le principe de génotypage des gènes cibles des dérivés benzimidazolés dextrogyres (BDCRB, TCRB) et lévogyre (maribavir). Ces techniques pourront être utilisées à terme pour étudier l'émergence des résistances, une fois ces molécules administrées en pratique clinique, avec des objectifs préventifs et curatifs des infections à CMV. Un autre objectif était d'appliquer ces outils à l'étude du polymorphisme naturel des protéines cibles de ces molécules et de réaliser une analyse de leur structure primaire et plus particulièrement de leur site actif afin de mieux comprendre les mécanismes moléculaires des résistances.

Une première étude a été réalisée en collaboration avec l'institut de Pharmacologie Chimique et Génétique de l'Université Paris V et le service de Virologie de l'hôpital Lariboisière. Elle avait pour objectifs d'analyser la conservation inter-espèces pour l'identification des domaines conservés et d'étudier le polymorphisme naturel et la structure primaire de la petite sous-unité du complexe terminase pUL56. Nous nous intéresserons ensuite au doigt de zinc N-terminal afin de déterminer sa fonction et le mécanisme d'action du BDCRB et du TCRB : ce travail fait l'objet d'une publication soumise à "*Virology*".

Une deuxième étude, réalisée en collaboration avec les mêmes équipes, avait pour but d'analyser la conservation inter-espèces, le polymorphisme naturel et la structure primaire de la grande sous-unité du complexe terminase pUL89 dans le cadre de l'étude du mécanisme d'action du BDCRB et du TCRB : ce travail fait l'objet d'une publication soumise dans "*Antiviral Therapy*".

Enfin nous avons analysé le polymorphisme naturel et la conservation inter-espèces de la protéine portail de la capsid pUL104 en vue de l'étude de la résistance au BDCRB et au TCRB, et de la protéine pUL27 dans le cadre de la résistance au maribavir.

Liste des publications

➡ **Article-1 : Polymorphism analysis of human cytomegalovirus S_TKc kinase pUL97 : interest of a sensitive sequencing assay coupled with a data base and bioinformatic tools.** G. Champier, A. Ducancelle, S. Hantz, N. Cogné, M. C. Mazon, D. Michel, F. Denis, and S. Alain. Soumis dans **Journal of Virological Methods**.

➡ **Article-2 : Detection of ganciclovir resistance after valacyclovir-prophylaxis in renal transplant recipients with active cytomegalovirus infections.** S. Alain, S. Hantz, C. Scieux, A. Karras, M. C. Mazon, J. C. Szelag, B. M. Imbert, A. M. Fillet, S. Gouarin, C. Mengelle, A. De Wilde, N. Cogné, G. Champier, S. Rogez, C. Legendre, and F. Denis. *Journal of Medical Virology*, 2004, 76, 566-573.

➡ **Article-3 : Early selection of a new UL97 mutant with a severe defect of ganciclovir phosphorylation after valaciclovir prophylaxis and short-term ganciclovir therapy in a renal transplant recipient.** S. Hantz, D. Michel, A. M. Fillet, V. Guingonis, G. Champier, M. C. Mazon, A. Bensman, F. Denis, T. Mertens, A. Dehee, and S. Alain. *Antimicrobial Agent and Chemother*, 2005, 49-4, 1580-1583.

➡ **Article-4 : Natural polymorphism of cytomegalovirus DNA Polymerase lies in two non-conserved regions spanning between domains delta-c and II and between domains III and I.** A. M. Fillet, L. Auray, S. Alain, K. Gurlain, F. Najjoullah, S. Gouarin, G. Champier, J. Carquin, I. Garrigues, N. Houhou, B. Imbert, A. Ducancelle, D. Thouvenaut, and M. C. Mazon. *Antimicrobial Agents Chemother*, 2004, 48-5, 1865-1868.

➡ **Article-5 : Genetic analysis of cytomegalovirus (CMV) *UL97* and *UL54* genes in sequential cerebrospinal fluid samples from AIDS patients treated by a combination of ganciclovir and foscarnet for CMV related neurological disease.** A. Ducancelle, *G. Champier*, S. Alain, A. M. Fillet, F. Petit, M. F. Sanson-Le-Pors, and M. C. Mazon. en préparation pour *Journal of Clinical Virology*.

➡ **Article-6 : Development and validation of a non-radioactive DNA polymerase assay to study cytomegalovirus resistance to foscarnet.** A. Ducancelle, S. Alain, *G. Champier*, A. M. Fillet, F. Petit, M. J. Sanson-Le-Pors, and M. C. Mazon. En préparation pour *Journal of Virological methods*.

➡ **Article-7 : Novel mutation in the *UL54* gene of human cytomegalovirus isolates conferring resistance to foscarnet.** A. Ducancelle, *G. Champier*, S. Alain, F. F. Petit, M. J. Sanson-Le-Pors, and M. C. Mazon. *Antiviral Therapy*, sous presse.

➡ **Article-8 : Genetic and Primary Structure Analysis of Human Cytomegalovirus pUL56 Packaging Protein: Role of the N-terminus Zinc Finger in the Benzimidazole D-ribonucleoside Mechanism of Action.** *G. Champier*, A. Couvreur, A. Rametti, M. C. Mazon, S. Bouaziz, F. Denis, and S. Alain. Soumis dans *Virology*, Avril 2006.

➡ **Article-9 : New functional domains of human cytomegalovirus packaging protein pUL89 identified by sequence analysis, and three-dimensional modeling of the catalytic site DEXDc.** *G. Champier*, S. Hantz, A. Couvreur, S. Stuppfler, M. C. Mazon, F. Denis, and S. Alain. Soumis à *Antiviral Therapy*. Mai 2006.

I. Développement de méthodes de génotypage standardisées du gène *UL97* : applications à la détection des résistances et à l'étude du polymorphisme et des domaines fonctionnels de pUL97

Malgré les progrès de la chimiothérapie antivirale et la diminution des cas de maladies à CMV, au cours du SIDA, les infections à CMV résistantes aux traitements restent fréquentes chez les patients transplantés. Le ganciclovir est le traitement le plus utilisé, en prévention et en traitement curatif. C'est donc vers pUL97, qui intervient dans son mécanisme d'action, que les travaux seront initialement dirigés. Le développement récent des indolocarbazoles et la démonstration du rôle de pUL97 dans la réplication ont relancé l'intérêt pour cette protéine.

1- Développement et analyse comparative de méthodes de séquençage du gène *UL97* et application à une étude du génotype de résistance de souches issues d'une cohorte de patients (Article-1)

Introduction

La diminution de la phosphorylation du GCV par mutation de la phosphotransférase pUL97 est l'un des mécanismes majeurs de résistance au GCV des isolats cliniques. Par ailleurs, l'apparition de mutations au sein du site catalytique portant l'activité kinase ou du site d'autophosphorylation de la protéine, peut être associée à des résistances au GCV ou au maribavir. Il apparaît primordial de disposer de méthodes fiables, sensibles, et reproductibles pour la détection des mutants résistants.

Aussi, le premier objectif de nos travaux a-il été la mise au point d'une méthode de séquençage du gène *UL97*, rapide, standardisée et adaptable aux différentes technologies (Dye Terminator, Applied Biosystems, et, Dye Primer Bayer Diagnosis), destinée à la détection des souches de CMV résistantes au GCV et ultérieurement au maribavir. Nous avons souhaité coupler ces méthodes de séquençage à un outil d'analyse et d'interprétation standardisé des

résultats. A cet effet, nous avons constitué une banque de données évolutive pouvant facilement être remise à jour en fonction des données de la littérature et de données personnelles, et contenant la séquence des souches de référence ainsi que les informations concernant les mutations de résistance connues. Nous avons ensuite validé les méthodes développées en mesurant leur fiabilité, leur reproductibilité et leur capacité à détecter les souches résistantes minoritaires à partir de 4 souches de référence (AD169, Towne, Toledo, et Davis), 26 isolats et 17 échantillons cliniques. L'aptitude des deux techniques à détecter les mutants minoritaires a été vérifiée à l'aide de mélanges de plasmides contenant le gène *UL97* de la souche de référence Towne et d'une souche portant la mutation de résistance A594V. A partir des résultats de séquençage, nous avons analysé le polymorphisme de pUL97 parmi les isolats cliniques de CMV. Enfin, sur la base de l'alignement de la séquence des domaines fonctionnels de phosphotransférases de structure connue, nous avons élaboré un modèle théorique du site catalytique portant l'activité kinase de pUL97, utilisable pour évaluer l'impact de mutations nouvelles.

Matériels et méthodes : Développés dans l'article complet ci-après.

Résultats et discussion

Les méthodes de séquençage complet du gène *UL97* que nous avons développées sont adaptées aux deux principaux systèmes disponibles (Applied Biosystems : ABI et Visible Genetics/Bayer Diagnosis : VGI). Elles permettent le génotypage de *UL97* à partir d'isolats ou d'échantillons cliniques. Elles associent rapidité d'exécution, sensibilité et simplicité d'analyse des séquences. Ces techniques permettent une analyse reproductible à partir d'une banque de données, que nous avons constituée, contenant l'ensemble des informations relatives aux mutations de résistance décrites dans la littérature. Le choix du système OpenGene™ associé au logiciel GeneObject3.1™ de Bayer, pour la comparaison des séquences et l'édition des rapports, est justifié par sa simplicité d'utilisation et sa fiabilité déjà reconnue pour le génotypage des souches de VIH. Les deux méthodes sont globalement aussi performantes pour le séquençage du gène *UL97*. Toutes deux permettent de séquencer près de 98 % du gène et 96 % en double sens. Les deux méthodes permettent de détecter les mutations avec 100 % d'efficacité en l'absence de mélange de populations, mais la méthode VGI semble plus sensible puisqu'elle permet de déceler des mutations minoritaires non détectées par la

méthode ABI sur 10 souches et isolats cliniques. Le résultat du test de sensibilité des deux méthodes pour la détection des mutations minoritaires confirme ces résultats préliminaires, puisque la méthode VGI permet de détecter les mutants minoritaires dès 20 % tandis que la méthode ABI ne les détecte qu'à partir de 35 % pour le séquenceur ABI3100 et 50 % pour le séquenceur mono-capillaire ABI310 (tableau 6). Il apparaît ainsi évident que la méthode VGI est plus appropriée à la recherche de mutations de résistance puisque, dans le cadre de mélanges de souches, le nombre de mutations échappant au diagnostic par cette technique est bien moindre que pour la méthode ABI. Elle permet donc de détecter plus précocement l'émergence d'une souche résistante au cours du traitement, et donc d'adapter plus rapidement celui-ci. Cette différence, déjà constatée pour le génotypage de résistance du VIH, peut résulter à la fois d'une différence de sensibilité entre les méthodes de séquençage et d'une différence de sensibilité entre les deux séquenceurs. Cependant, les progrès associés à l'utilisation d'un séquenceur plus récent (ABI3100 versus ABI310) ne sont pas évidents. Il n'est donc pas impossible que le défaut de détection des souches minoritaires soit lié à la méthode de séquençage faisant appel au système ABI, pourtant utilisée en routine dans de nombreux laboratoires.

La comparaison de la séquence en acides aminés de pUL97 avec la séquence d'autres sérine/thréonine kinases a permis de classer pUL97 plus précisément dans la famille des S_TKc serine/thréonine kinases. Du fait de la forte conservation de la séquence des domaines fonctionnels de cette classe de protéine et de leur structure tridimensionnelle nous avons élaboré un modèle théorique de la structure du site catalytique de l'activité kinase de pUL97. Nous avons mis à profit ce modèle pour étudier l'impact des mutations N467D et H469Y. Le rôle de H469Y est controversé puisque cette mutation a été décrite dans des souches sensibles ou issues de patients ne répondant plus au traitement, sans association avec d'autres mutations. Par cette méthode, nous avons montré que H469Y ne pouvait avoir que peu d'effet sur la structure du site catalytique au même titre que N467D. Cette analyse a confirmé que l'utilisation d'un tel modèle pouvait permettre d'évaluer l'effet de mutations localisées dans, ou à proximité, des domaines conservés du site kinase de la phosphotransférase pUL97 ; ce modèle peut donc, au même titre que les techniques traditionnelles, constituer un outil d'étude des résistances au ganciclovir ou au maribavir.

La méthode de génotypage que nous avons développée présente ainsi plusieurs avantages : elle est applicable dans tous les laboratoires de virologie clinique ; elle permet la détection précoce des mutants résistants et elle peut s'adapter rapidement à la détection des nouvelles mutations de résistance au GCV ou aux nouveaux antiviraux, tel le maribavir. De plus, le séquençage de la totalité du gène permet l'analyse du polymorphisme naturel de pUL97. Enfin, le modèle théorique que nous avons développé peut servir de base à une meilleure compréhension de l'impact des nouvelles mutations.

➡ Article-1

Polymorphism analysis of human cytomegalovirus S_TKc kinase pUL97 : interest of a sensitive sequencing assay coupled with a data base and bioinformatic tools.
G. Champier, A. Ducancelle, S. Hantz, N. Cogné, M. C. Mazon, D. Michel, F. Denis, and S. Alain. Soumis à *Journal of Virological Methods*, mai 2006.

Tableau 6 : Comparaison de la sensibilité des méthodes de séquençage VGI et ABI pour la détection des mutations minoritaires

La sensibilité des méthodes de séquençage VGI et ABI a été testée pour la détection de la mutation A594V (GCG →GTG) sur un mélange de plasmides de titre connu dans lesquels a été cloné le gène UL97 de la souche de référence Towne et d'une souche portant la mutation A594V.

-GCV : la mutation A594V n'est pas détectée ; +/-GCV : la mutation est détectée par la méthode de séquençage (visible sur l'électrophorégramme) mais n'est pas signalée par le système d'analyse ; +GYG : la mutation minoritaire est détectée et le mélange est signalé par le système d'analyse (Y=G+C) ; +GTG : la mutation GTG est détectée.

La méthode VGI permet de détecter le mutant minoritaire dans une proportion de 20 % mais la mutation n'est pas signalée par le système d'analyse, elle est signalée dès 25 %. Pour le mélange à 30 % la mutation n'est pas signalée sur l'électrophorégramme, mais le système la prend en compte dans l'alignement des contigs grâce à la séquence antisens. Le pic correspondant à la mutation minoritaire augmente progressivement jusqu'à 50 %. Pour la méthode ABI couplée au séquenceur monocapillaire ABI310, le pic correspondant à la mutation minoritaire n'apparaît qu'à 40 % de mélange et n'est réellement détectable qu'à 50 %. Avec le séquenceur 16 capillaires ABI3100, la mutation est détectée à 35 % de mélange (jusqu'à 25 % le pic correspondant est noyé dans le bruit de fond).

Proportion de souche mutante dans le mélange	Détection des mutations			Electrophoregrammes		
	VGI	ABI 310	ABI 3100	VGI	ABI 310	ABI 3100
0%	- GCG	- GCG	- GCG			
5%	- GCG	- GCG	- GCG			
10%	- GCG	- GCG	- GCG			
15%	- GCG	- GCG	- GCG			
20%	+/- GCG	- GCG	- GCG			
25%	+ GYG	- GCG	- GCG			
30%	+ GYG	- GCG	- GCG			
35%	+/- GCG	- GCG	+/- GCG			
40%	+ GYG	- GCG	+/- GCG			
45%	+ GYG	- GCG	+/- GCG			
50%	+ GYG	+/- GCG	+/- GCG			
100%	+ GTG	+ GTG	+ GTG			

Tableau 6 : Comparaison de la sensibilité des méthodes de séquençage VGI et ABI pour la détection des mutations minoritaires

2- Détection de résistances au ganciclovir après prophylaxie par valaciclovir chez des receveurs de rein présentant une infection à cytomégalovirus (Article-2)

Introduction

De nombreuses stratégies antivirales sont utilisées pour le traitement prophylactique ou curatif des infections à CMV en fonction du profil du patient. Il a été montré que le valaciclovir, VCV, prodrogue de l'aciclovir, administré dans le cadre de traitements prophylactiques chez les transplantés de rein, retardait la survenue, ou limitait efficacement l'incidence des maladies à CMV (Lowance, Neumayer *et al.* 1999). Le ganciclovir (9-(1,3-dihydroxy-2-propoxyméthyl)-guanine), GCV, et l'aciclovir (9-(3-hydroxy-2-propoxyméthyl)-guanine), ACV, deux analogues acycliques de la désoxyguanosine, partagent le même mécanisme d'action pour l'inhibition de la synthèse de l'ADN viral. Tous deux inhibent spécifiquement la polymérase virale pUL54 après avoir été primophosphorylés par la kinase virale pUL97. Quelques cas cliniques d'isolats résistants au ganciclovir ont été décrits chez des patients traités par aciclovir dans le cadre d'un traitement curatif chez un patient présentant une leucémie chronique (Erice, Gil-Roda *et al.* 1997), ou dans celui d'un traitement prophylactique chez un patient transplanté de moelle osseuse (Erice, Borrell *et al.* 1998).

Il était donc naturel d'appliquer les outils développés à l'étude de souches cliniques obtenues dans le cadre de transplantations, afin d'évaluer notamment le risque d'émergence de souches résistantes chez les receveurs de rein présentant une répllication virale sous prophylaxie par valaciclovir, ou à l'arrêt de celle-ci. Ainsi, avons-nous réalisé une étude rétrospective multicentrique à partir de prélèvements issus de 23 transplantés de rein ayant reçu une prophylaxie par valaciclovir.

Matériels et méthodes : Développés dans l'article complet ci-après.

Résultats et discussion

Nous avons ainsi validé notre méthode, au cours d'une étude rétrospective multicentrique, visant à étudier les modifications de séquence du gène *UL97* à partir de prélèvements de sérum provenant de transplantés de rein qui avaient été mis sous prophylaxie par valaciclovir.

L'aciclovir et sa prodrogue ayant le même mécanisme d'action que le ganciclovir, l'émergence de mutants résistants au ganciclovir, portant une mutation de pUL97, après traitement par ACV ou par VCV, est susceptible de survenir. Quelques cas d'émergence de souches résistantes au GCV sous pression de sélection au VCV, *in vivo*, et de souches portant une mutation de résistance au GCV après traitement prophylactique par ACV ont été décrits, mais jamais après traitement par VCV (Erice, Gil-Roda *et al.* 1997; Erice, Borrell *et al.* 1998).

Dans cette étude multicentrique, la méthode de génotypage que nous avons développée nous a permis de décrire l'émergence d'une souche portant une mutation de résistance au GCV, M460I, après quatre mois de prophylaxie par VCV. Nous démontrons ainsi, pour la première fois, la possibilité d'émergence d'une résistance au ganciclovir après traitement prophylactique par valaciclovir. Malgré le nombre de patients inclus trop faible pour mesurer l'incidence de la résistance au GCV après prophylaxie par valaciclovir, cette étude souligne la nécessité d'une surveillance de l'émergence des résistances au cours des traitements préventifs, *a fortiori* si la réplication persiste sous traitement prophylactique.

➡ Article-2

Detection of ganciclovir resistance after valacyclovir-prophylaxis in renal transplant recipients with active cytomegalovirus infections. S. Alain, S. Hantz, C. Scieux, A. Karras, M. C. Mazon, J. C. Szlag, B. M. Imbert, A. M. Fillet, S. Gouarin, C. Mengelle, A. De Wilde, N. Cogné, G. Champier, S. Rogez, C. Legendre, and F. Denis. *Journal of Medical Virology* 2004, 76, 566-573.

3- Etude d'une nouvelle mutation de résistance au ganciclovir sélectionnée par prophylaxie au valaciclovir et traitement de courte durée par ganciclovir après transplantation rénale (Article-3)

Introduction

Une autre application de notre méthode de génotypage a été la description de l'émergence d'un isolat résistant au ganciclovir, portant une nouvelle mutation de la phosphotransférase pUL97, après prophylaxie par valaciclovir et traitement de courte durée par ganciclovir.

L'étude porte sur un patient séronégatif traité après allogreffe d'un rein prélevé chez un donneur séropositif (R-D+). La prophylaxie par valaciclovir, destinée à limiter le risque de survenue de maladie à CMV, a débuté deux jours après la greffe. Après 64 jours de traitement, une infection asymptomatique a été diagnostiquée par antigénémie pp65 conduisant les cliniciens à remplacer le traitement prophylactique par valaciclovir par un traitement curatif par ganciclovir. Ce traitement poursuivi pendant 3 semaines a permis de stopper la réplication virale. Le traitement prophylactique par VCV a repris au 83^{ème} jour post-greffe ; cependant, l'antigénémie est rapidement redevenue positive, conduisant les cliniciens à prescrire, de nouveau, un traitement par ganciclovir dès le 96^{ème} jour post-greffe. Néanmoins, même si ce traitement a permis de contenir l'infection dans un premier temps, l'antigénémie pp65 s'est rapidement repositivée ce qui a mené les cliniciens à suspecter une résistance au ganciclovir et à remplacer le traitement par GCV par un traitement par PFA qui s'est avéré efficace.

Afin d'étudier le phénotype et le génotype de résistance de la souche à l'origine de ces épisodes d'infections asymptomatiques, des isolats ont été mis en culture à partir de prélèvements sanguins au 68^{ème} et au 133^{ème} jour post-greffe (respectivement notés G1 et G2). Le phénotype de résistance au ganciclovir et à l'aciclovir a été évalué par mesure de la CI50 des deux isolats selon la méthode développée par le groupe CMV AC11 de l'ANRS. En parallèle, nous avons étudié le génotype de résistance des isolats G1 et G2 par séquençage complet des gènes *UL97* et *UL54*.

Matériels et méthodes : Développés dans l'article complet ci-après.

Résultats et discussion

Le calcul de la CI50 des isolats G1 et G2, par rapport à la souche de référence AD169, par mesure de la réduction du nombre de foyers d'effet cytopathique, a révélé une évolution du phénotype de résistance entre le 68^{ème} jour et le 133^{ème} jour post-greffe. En effet, avec des CI50 de 2 μ M et 60 μ M, respectivement, l'isolat G1 est sensible au ganciclovir et à l'aciclovir. Par contre, l'isolat G2, prélevé après une durée cumulée de traitement par GCV de 58 jours (20 jours : J64 à J83 puis 38 jours : J96 à J133), avec des CI50 de 16.5 μ M pour le GCV et 123 μ M pour l'ACV, est 8 fois moins sensible au GCV que l'isolat G1, 16 fois moins que la souche AD169, et 2 fois moins sensible à l'ACV que l'isolat G1.

L'analyse du génotype de résistance par amplification et séquençage complet des gènes *UL97* et *UL54* a révélé que, d'une part, aucun des isolats ne porte de mutation de *UL54*, et d'autre part, tandis que l'isolat G1 ne porte pas de mutation sur *UL97*, l'isolat G2 présente une nouvelle mutation : délétion du codon 601.

Afin d'étudier l'effet de la délétion 601 sur la résistance au ganciclovir, le gène *UL97* portant cette mutation a été cloné dans un plasmide, puis testé par la technique du virus vaccinal recombinant selon la méthode décrite par Metzger et Michel, (Metzger, Michel *et al.* 1994). Nous avons ainsi montré que la délétion était associée à une diminution de 90 % du niveau de phosphorylation du GCV. La mesure de la capacité des kinases pUL97, mutée et sauvage, à s'autophosphoryler, réalisée selon la méthode décrite par Michel et coll. (Michel, Schaarschmidt *et al.* 1998), n'a révélé aucune différence entre la kinase sauvage et la kinase mutée. **Ceci nous a permis de démontrer, d'une part, que la délétion T601 est associée à une résistance au ganciclovir et, d'autre part, que ce défaut de phosphorylation du ganciclovir n'est pas lié à l'activité d'autophosphorylation de pUL97.**

Ainsi, cette étude nous a-t-elle permis, d'une part, de décrire l'émergence d'une résistance après prophylaxie au valaciclovir et traitement de courte durée par ganciclovir, et d'autre part, de démontrer le rôle de la délétion T601 dans la résistance au ganciclovir. La délétion T601 au sein de la kinase pUL97 devra désormais être recherchée sur les souches cliniques issues de patients ne répondant plus aux traitements par GCV ou par VCV.

➡ **Article-3**

Early selection of a new UL97 mutant with a severe defect of ganciclovir phosphorylation after valaciclovir prophylaxis and short-term ganciclovir therapy in a renal transplant recipient. S. Hantz, D. Michel, A. M. Fillet, V. Guingonis, G. Champier, M. C. Mazon, A. Bensman, F. Denis, T. Mertens, A. Dehee, and S. Alain. *Antimicrobial Agent and Chemother.* 2005, 49-4, 1580-1583.

II- Développement d'outils d'étude du polymorphisme naturel, des résistances et de l'activité de la polymérase virale pUL54, et applications

Le deuxième axe de notre travail porte sur le gène *UL54*, et plus particulièrement sur le développement d'outils de génotypage de *UL54* sur le modèle de *UL97*, et de méthodes d'étude de l'activité enzymatique et de la sensibilité aux antiviraux de la polymérase pUL54. Cette dernière partie du travail a été réalisée dans le laboratoire de Virologie de l'Hôpital Lariboisière à Paris dans le cadre de la thèse d'Université d'Alexandra Ducancelle.

Le gène *UL54* est le siège de mutations de résistance aux trois antiviraux actuels, GCV, CDV et PFA. Ces mutations sont nombreuses et réparties sur les différents domaines fonctionnels de l'enzyme. De nouvelles mutations sont régulièrement décrites ; leur rôle doit être démontré par transfert de marqueur. La connaissance du polymorphisme naturel de l'enzyme constitue donc une étape clé dans l'analyse des mutations inédites et, au-delà, dans l'étude des domaines fonctionnels de l'enzyme.

Comme le montrent les publications ci-après, nous avons d'abord appliqué les outils de génotypage et de phénotypage à l'étude du polymorphisme et à la détection des mutations de résistance dans les isolats cliniques. Puis, dans un deuxième temps, l'élaboration de modèles structuraux a contribué à l'analyse des relations structure/fonction de la polymérase afin d'apprécier l'impact de nouvelles mutations sur la résistance et sur l'activité polymérasique.

Développement des méthodes de génotypage de pUL54 :

Forts des résultats obtenus pour le génotypage de *UL97*, nous avons initialement prévu de développer une méthode de séquençage du gène *UL54* adaptable aux deux principaux fabricants (Applied Biosystems : ABI, et Visible Genetics/Bayer Diagnosis : VGI).

Dans cette optique, nous avons sélectionné, selon les mêmes critères que pour le génotypage de *UL97*, 4 amorces permettant l'amplification par PCR nichée du gène *UL54*, et 12 oligonucléotides permettant son séquençage complet en double sens (Article 5).

A l'instar de la méthode de génotypage de *UL97*, la méthode que nous avons développée avec la technologie ABI permet le séquençage complet du gène *UL54* à partir d'isolats ou d'échantillons cliniques. Elle associe rapidité d'exécution, sensibilité et simplicité d'analyse

des séquences. Par ailleurs, comme pour *UL97*, afin de réaliser une analyse simple, rapide et reproductible des résultats, nous avons opté pour le système OpenGene™, associé au logiciel GeneObject3.1™ de Bayer. Ceci nous a permis de coupler la méthode d'analyse des séquences à une banque de données, que nous avons constituée, contenant l'ensemble des informations relatives aux mutations de résistance décrites dans la littérature et la séquence de la souche de référence AD169.

Il nous a été impossible de mettre au point une méthode de séquençage du gène *UL54* selon la technologie Dye primer, en raison de la présence de pics stop incompressibles (figure 20) malgré l'optimisation des conditions d'amplification et de séquençage. La séquence du gène *UL54* est en effet très riche en nucléotides G+C (65 %), ce qui facilite la constitution de structures quaternaires de l'ADN. Ces repliements peuvent provoquer la libération de la matrice par la polymérase, durant la synthèse, engendrant des fragments dégénérés ne portant pas de terminateur à leur extrémité C-terminale. Ceux-ci peuvent rapidement être prédominants par rapport aux fragments de séquençage. Les deux systèmes de séquençage sont des adaptations de la méthode de Sanger, mais diffèrent par le mode de détection. Le système ABI s'appuie, pour la détection des fragments de séquençage, sur un marquage différentiel des terminateurs (ddXTP) par des fluorochromes distincts, permettant leur identification lors de l'électrophorèse : dRG6 pour ddATP, dROX pour ddCTP, dR110 pour ddGTP et dTAMRA pour ddTTP. Ce système détecte spécifiquement les fragments de séquençage portant un terminateur à leur extrémité C-terminale. Le système VGI s'appuie sur un marquage différentiel des amorces de séquençage (Cyanine 5.0 pour l'amorce sens et Cyanine 5.5 pour l'amorce antisens). Ceci permet de séquencer un fragment d'ADN dans les deux sens au cours d'une même réaction mais impose de réaliser une réaction par terminateur, afin de les différencier, pour chacune des 6 régions correspondant aux couples d'amorces UL54-1/UL54-2, UL54-3/UL54-4, UL54-5/UL54-6, UL54-7/UL54-8, UL54-9/UL54-10, UL54-11/UL54-12. Cela permet de gagner en sensibilité puisque les fragments séquencés sont amplifiés pendant le séquençage, mais présente l'inconvénient de détecter aussi les fragments ne portant pas de terminateur à leur extrémité C-terminale. La présence des fragments dégénérés se traduit par une intensité de fluorescence plus importante que pour les fragments de séquençage : la proportion de chaque fragment de séquençage étant en moyenne de 1/300 (puisque le mélange réactionnel initial contient 1 ddXTP/300dXTP). Ceci se traduit, au niveau de l'électrophorégramme, par la présence de grands pics dits "pics stop" dont l'amplitude peut

dépasser celle des "pics d'amorces" (correspondant au signal émis par l'excès d'amorces) et des "pics de fin" (correspondant au signal émis par les fragments complètement amplifiés).

Le système d'analyse des électrophorégrammes, dans le système VGI, s'appuie sur un programme informatique ("Base calling") qui compare l'amplitude du signal émis par chaque fragment à la moyenne de l'amplitude globale de tous les fragments. Ainsi, la présence des pics stop perturbe fortement l'analyse. Nous avons testé de nombreuses conditions destinées à favoriser la dénaturation des fragments, durant l'amplification du gène *UL54* ou durant la réaction d'amplification (figure 20). Dans un premier temps, nous avons modifié divers paramètres de la PCR : la polymérase (Takara, Cambrex Biosciences, Expand High Fidelity et Long Expand, Roche), les cycles d'amplification, et la concentration de divers agents dénaturants. Aucune de ces conditions n'a permis d'améliorer la qualité des séquences. Dans un deuxième temps, nous avons tenté d'optimiser la réaction de séquençage elle-même, en modifiant certains paramètres : temps et température d'hybridation et/ou de dénaturation ; proportion de chaque amorce ; ajout d'agents dénaturants : diméthylsulfoxyde (DMSO), sulfate d'ammonium (NH_2SO_4), glycérol, MgCl_2 .

Le résultat de ces tests est présenté dans la figure 20. Selon les conditions, **nous avons réussi à améliorer la lisibilité des séquences de certains fragments du gène, sans pouvoir harmoniser les conditions optimales pour les 6 régions, ce qui rend fastidieuse et coûteuse l'utilisation de cette technique dans le cadre du génotypage de *UL54* et nous a amené à abandonner cette approche par le système *Dye primer***. D'ailleurs, Bayer, qui commercialise ce système VGI, a annoncé son intention de changer de technologie et de développer un système hybride *Dye primer/Dye terminator* permettant de cumuler les avantages des deux technologies ; ce qui obligera à une adaptation de notre procédé. Aussi, avons-nous décidé de ne pas poursuivre l'optimisation du génotypage de *UL54* selon la technologie *Dye primer*, en attendant la commercialisation des séquenceurs de nouvelle génération, et de continuer nos études en utilisant la technique ABI, malgré la différence de sensibilité dans la détection des mutants minoritaires. De ce fait, les séquences des gènes des autres cibles ont également été développées avec la méthode ABI.

Nous avons auparavant vérifié la fiabilité et la reproductibilité de la méthode de génotypage de *UL54* (amplification et séquençage) selon la technique ABI, par l'amplification et le séquençage à trois reprises du gène *UL54* des quatre souches de référence AD169, Toledo, Towne et Davis à partir de produits d'amplification indépendants ce qui a permis de démontrer une reproductibilité inter-essai de 100 %.

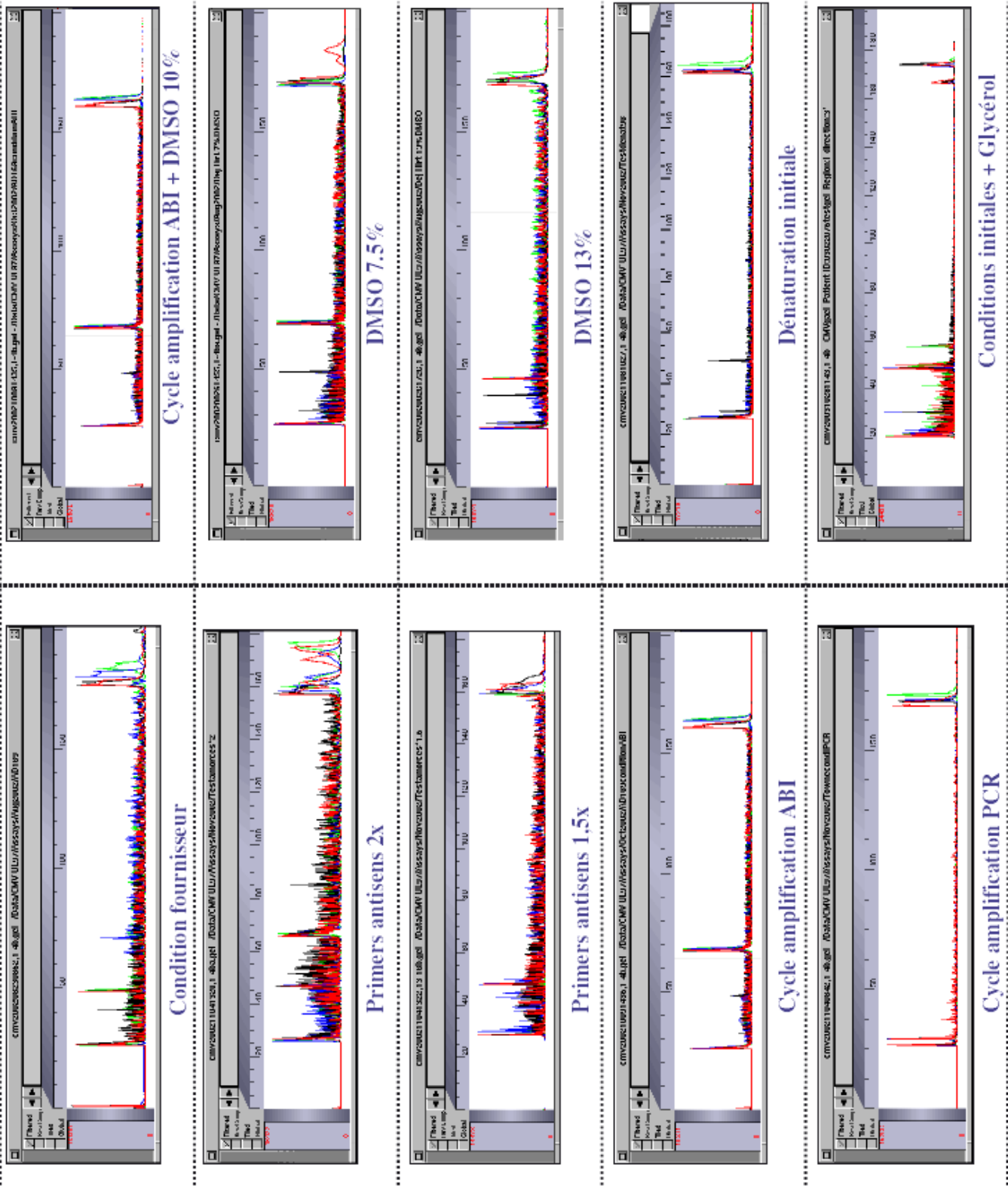
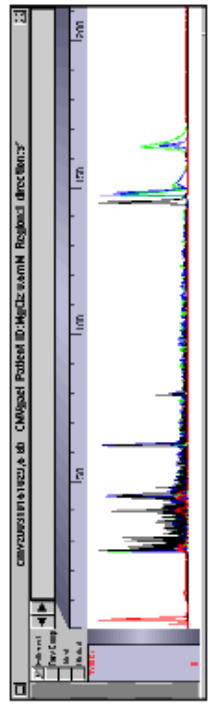
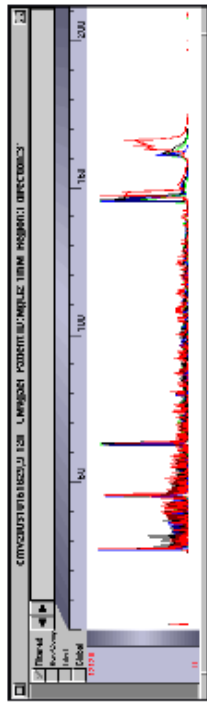


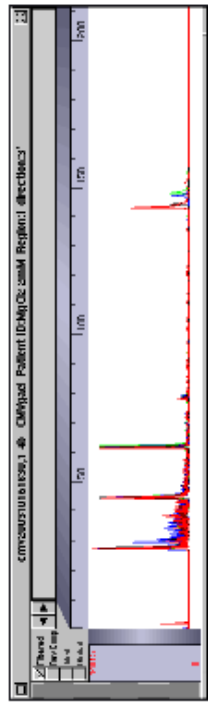
Figure 20 : Optimisation de la méthode de séquençage de UL54 par le système Dye primer (1/3)



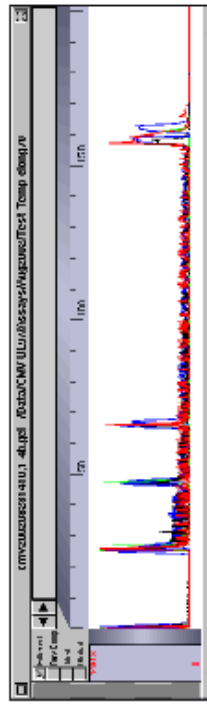
MgCl₂ 0,5mM



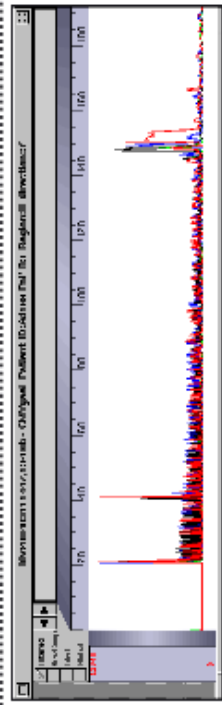
MgCl₂ 1mM



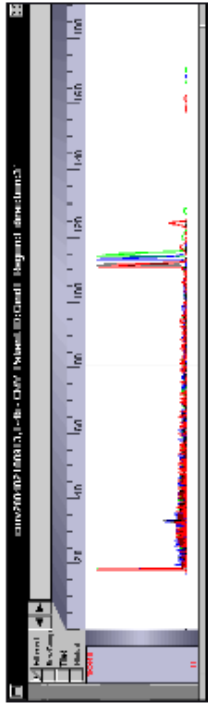
MgCl₂ 2mM



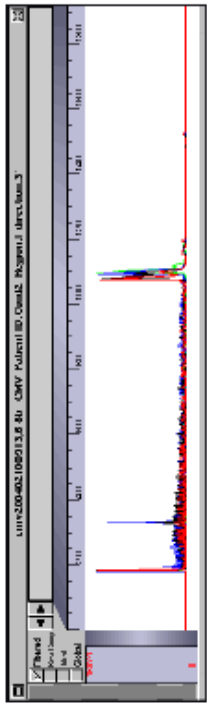
Elongation à 70°C



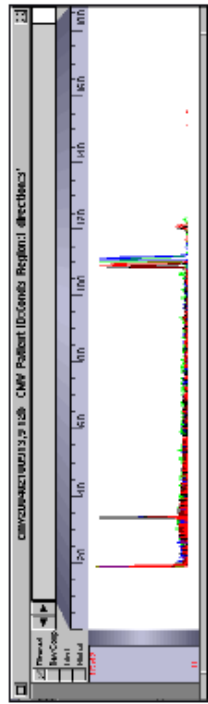
Ampli-initiale Long Expand +Dénaturation + Primer antisens 2x



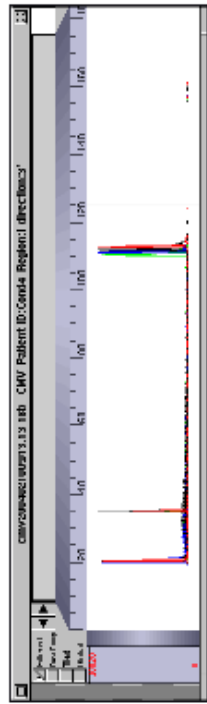
NH₂SO₄ 5mM, MgCl₂ s 0,5mM



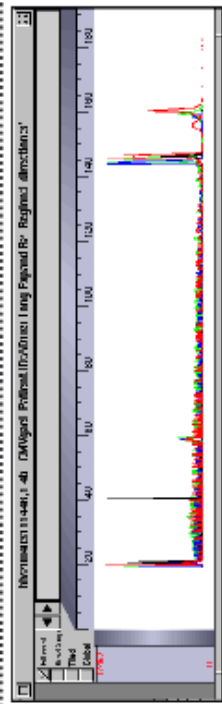
NH₂SO₄ 5mM, MgCl₂ 1mM



NH₂SO₄ 5mM, MgCl₂ 1,5mM



NH₂SO₄ 5mM, MgCl₂ 2mM



Ampli-initiale Long Expand + Primer antisens 2x

Figure 20 : Optimisation de la méthode de séquençage de UL54 par le système Dye primer (2/3)

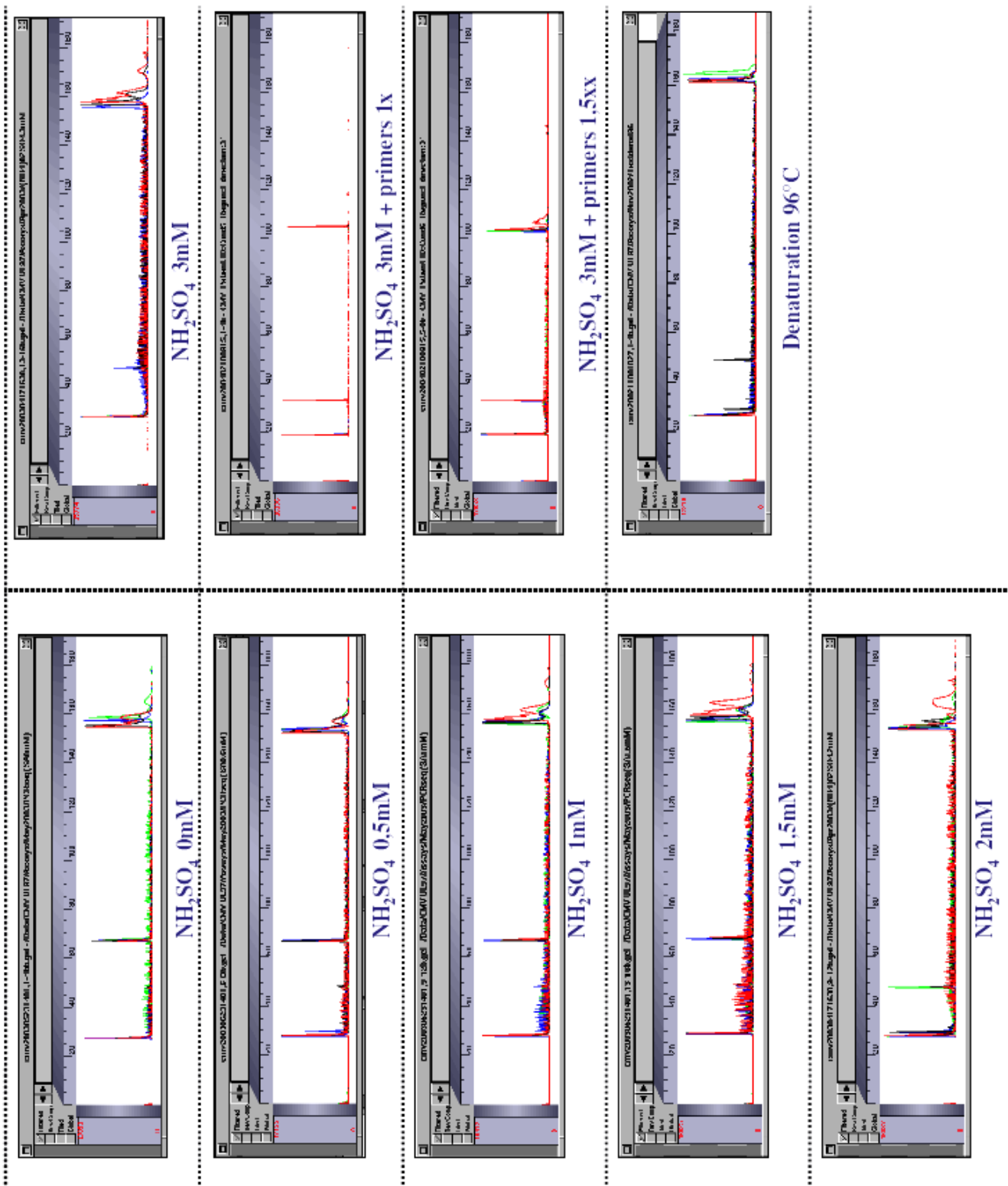


Figure 20 : Optimisation de la méthode de séquençage de UL54 par le système Dye primer (3/3)

Figure 20 : Optimisation de la méthode de séquençage de UL54 par le système Dye primer

Cette figure représente les profils des électrophorégrammes obtenus lors de l'optimisation de la méthode de séquençage par la technique VGI (Dye primer) pour la région I (couple d'amorces UL54-1/UL54-2). Toutes ces conditions ont été testées pour les 6 régions. Les conditions testées sont indiquées sous les électrophorégrammes.

Chaque valeur représente la concentration de réactif ajouté au tampon commercial de la trousse de séquençage 7-Deaza-dGTP, Cy5TM/Cy5.5, Dye Primer, Cycle Sequencing Kit®, Visible Genetics Inc. (Bayer). Sur les électrophorégrammes, plusieurs pics sont identifiables : les pics d'amorces, correspondant au signal émis par l'excès d'amorces ; les pics de fin correspondant au signal émis par le fragment de séquençage complètement amplifié ; et les pics stop qui correspondent aux fragments dégénérés.

A noter que, pour la région I, la condition optimale d'amplification correspond à l'utilisation des conditions recommandées par le fournisseur avec ajout de 5 mM de NH₂SO₄ et 0,5 mM de MgCl₂, qui ont permis d'éliminer en grande partie les pics stop permettant l'interprétation des séquences. Il n'a toutefois pas été possible d'harmoniser les conditions de séquençage des 6 régions.

1- Etude de la variabilité inter-espèces et intra-espèces des régions localisées entre les régions 8-C et II et entre les régions III et I de la polymérase pUL54 (Article-4)

Introduction

Dans le cadre du développement d'outils standardisés de détection et d'étude des souches de cytomégalovirus résistantes aux antiviraux, et de l'étude des mécanismes de résistance, la connaissance du polymorphisme naturel de la polymérase pUL54 paraît être indispensable. Plusieurs études prospectives ou rétrospectives d'isolats cliniques sensibles ou résistants aux antiviraux ont été publiées. Cependant, une étude américaine a rapporté le polymorphisme du gène *UL54* de 40 souches sensibles (Chou, Lurain *et al.* 1999). Mais il faut noter que certaines souches provenaient de patients ayant reçu des traitements au moment de l'inclusion, et dont la sensibilité au foscarnet n'avait pas été testée *in vitro*. Il était donc intéressant d'étudier le polymorphisme naturel des souches circulant en France afin de comparer les résultats à ceux de l'étude américaine.

Ce travail multicentrique a permis l'étude du polymorphisme des souches de cytomégalovirus provenant de patients naïfs de tout traitement antiviral anti-CMVH, issus de différentes régions françaises. Le gène *UL54* a été séquencé à partir de 4 souches de référence (AD169, Towne, Toledo, et Davis) et de 42 isolats ou prélèvements cliniques, issus de 29 enfants atteints d'infections congénitales, de 11 receveurs d'organe et de 2 patients infectés par le VIH. Parallèlement à l'étude génotypique, le phénotype de résistance de 24 isolats cliniques a été examiné dans deux laboratoires, Limoges et Lariboisière, selon la technique consensus de l'ANRS, par calcul de l'index de sensibilité 50 % pour le GCV, le CDV et le PFA (cf. paragraphe-III-4-d).

Matériels et méthodes : Développé dans l'article complet ci-après.

Résultats et discussion

Ce travail a permis de confirmer le haut niveau de conservation du gène *UL54* avec un taux d'homologie atteignant 98 % à l'échelle nucléotidique, confirmant ainsi les résultats de l'étude américaine (Chou, Lurain *et al.* 1999). A l'exception d'une délétion de 8 codons concernant une souche, la grande majorité des mutations détectées aboutit à des substitutions ponctuelles d'acides aminés. L'analyse approfondie de séquences, à partir de souches dont la sensibilité vis-à-vis des trois antiviraux a été contrôlée, montre que les polymorphismes se concentrent, dans deux régions variables de la protéine localisées entre les régions conservées δ -C et II ($\{\delta$ -C - II $\}$) d'une part, et III et I ($\{\text{III} - \text{I}\}$) d'autre part. Cette étude suggère que le polymorphisme est indépendant de l'origine géographique des souches : parmi les polymorphismes répertoriés, 5 substitutions d'acides aminés avaient déjà été identifiées par Chou et coll. : 4 correspondent à des différences entre souches de référence (A885T, N898D, N685S, et S897L), et la 5^{ème} n'a été détectée que chez des souches issues de prélèvements cliniques (S655L). Certains polymorphismes décrits dans l'étude de Chou et coll. n'ont pas été retrouvés dans notre étude, suggérant des divergences phylogéniques mineures dépendant de l'origine géographique des souches. L'alignement de la séquence des deux régions variables $\{\delta$ -C - II $\}$ et $\{\text{III} - \text{I}\}$ de la polymérase du CMVH avec les séquences homologues d'autres α -like polymérases (DNA polymérases humaines, DNA polymérases de HHV-1, du VZV, de HHV-6, du CMV du rat, de l'EBV, du bactériophage RB69, du phage T4) révèle une grande hétérogénéité de ces régions. La variabilité inter-espèces et intra-espèces de ces régions révèle qu'il s'agit probablement de régions non fonctionnelles des polymérases virales.

➡ Article-4

Natural polymorphism of cytomegalovirus DNA polymerase lies in two non-conserved regions spanning between domains delta-c and II and between domains III and I. A. M. Fillet, L. Auray, S. Alain, K. Gurlain, F. Najioullah, S. Gouarin, G. Champier, J. Carquin, I. Garrigues, N. Houhou, B. Imbert, A. Ducancelle, D. Thouvenaut, and M. C. Mazon. *Antimicrobial Agents Chemotherapy*. 2004, 48-5, 1865-1868.

2- Analyse du génotype et du phénotype de souches séquentielles issues de patients infectés par le VIH et traités par ganciclovir et par foscarnet pour atteintes neurologiques à CMV (Article-5)

Introduction

Les atteintes neurologiques à CMV et tout particulièrement les ventriculoencéphalites et les radiculomyélites sont parmi les manifestations cliniques les plus graves de la maladie à CMV au cours du sida. Malgré la diminution des cas de maladie à CMV depuis l'avènement des trithérapies antirétrovirales, les patients, qui échappent au traitement, ceux qui n'y ont pas accès, ou ceux déclarant leur maladie à VIH au stade sida, restent menacés. Le traitement de ces manifestations neurologiques est le plus souvent un échec. Plusieurs cas d'émergence de résistance au cours de ces pathologies, chez des patients traités de façon itérative par ganciclovir, foscarnet ou l'association des deux molécules, ont été décrits, et quelques études soulignent le risque de compartimentation des souches, avec émergence et persistance de la souche mutée au niveau du système nerveux central, alors que la souche mutée n'est pas détectable dans le sang périphérique. Il est donc important de détecter ces souches résistantes *in situ*, dans le liquide céphalo-rachidien (LCR) afin d'adapter rapidement le traitement anti-CMV.

Afin de définir le risque d'émergence de résistance après traitement combiné par ganciclovir et foscarnet nous avons appliqué les méthodes de génotypage précédemment développées à la détection directe des isolats résistants dans le liquide céphalo-rachidien (LCR) de 31 patients atteints d'encéphalite ou de radiculomyélite et recevant un traitement combiné par ganciclovir et foscarnet au cours d'un essai thérapeutique. Dans cette optique, l'amplification et le séquençage des gènes *UL97* et *UL54* ont été directement tentés à partir des échantillons de LCR. 29 échantillons avant traitement étaient disponibles et 17 échantillons après bithérapie.

Matériels et méthodes : Développés dans l'article complet ci-après.

Résultats et discussion

Ce travail a démontré la possibilité de détecter directement les souches résistantes dans le LCR, à l'aide de notre technique de génotypage. Nous avons en effet séquencé les régions d'intérêt de *UL97* et *UL54* dans 28 cas sur 29 avant traitement et 14 cas sur 17 après traitement. Cependant, pour certains échantillons, il n'a pas été possible d'amplifier le gène *UL54* dans sa totalité, et la recherche de mutations a été effectuée à partir de produits d'amplification partielle, incluant soit la totalité des régions conservées de *UL54*, soit une partie seulement de ces régions. A ceci deux causes possibles : la faible charge virale, en particulier après traitement, et la détérioration ou la fragmentation possible de l'ADN, du fait de la durée prolongée de conservation des prélèvements.

Nous avons ainsi mis en évidence, chez 2 patients, l'émergence de mutants résistants, directement au site de l'infection, et détecté chez un autre patient, prétraité, une substitution E756G, conférant une résistance au foscarnet. Connaissant la possibilité d'émergence de souches résistantes localisée au LCR (Alain, Mazon *et al.*, 1995), ceci est particulièrement important pour la prise en charge thérapeutique.

Ce travail montre une fréquence d'émergence de résistance dans le LCR de 14%, sans différence dans l'évolution clinique des patients sous traitement. Par ailleurs, cette étude a permis de retrouver des mutations connues, de décrire et d'étudier deux mutations inédites : 1) La substitution T458I au sein de pUL97, proche d'une mutation de résistance connue M460V, et pour laquelle la modélisation tridimensionnelle du site ATP-asiq suggère le rôle dans la résistance au ganciclovir, malgré son association avec la mutation de résistance K513N, sera étudiée dans la suite de nos travaux. Le clonage du gène *UL97* muté et la mutagénèse du codon 458 sont en cours, dans l'objectif d'identifier le rôle de cette mutation par la technologie du virus vaccinal recombinant. 2) La substitution E756G au sein de pUL54 a été identifiée comme une mutation de résistance au foscarnet par mesure de son activité polymérasique. Ces résultats sont confortés et expliqués par le modèle tridimensionnel que nous avons obtenu du fait de la localisation importante de ce résidu à proximité de l'hélice- α située à l'extrémité des doigts de la polymérase. De même, la perte importante d'activité polymérasique liée à la mutation D717Y est confortée par le haut degré de conservation de ce résidu parmi les polymérases et par sa localisation au niveau des « doigts » de la polymérase observée dans notre modèle.

Ainsi, ce travail démontre l'intérêt en pratique clinique des outils que nous avons développés au cours de notre travail. Il détermine la fréquence d'émergence des souches résistantes sous bithérapie et suggère que l'évolution clinique des patients ne dépend pas du caractère résistant ou non de la souche présente dans le LCR.

➡ Article-5

Genetic analysis of cytomegalovirus (CMV) *UL97* and *UL54* genes in sequential cerebrospinal fluid samples from AIDS patients treated by a combination of ganciclovir and foscarnet for CMV related neurological disease. A. Ducancelle, G. Champier, S. Alain, A. M. Fillet, F. Petit, M. F. Sanson-Le-Pors, and M. C. Mazon. En préparation pour *Journal of clinical Virology*.

3- Développement d'un nouveau test non radioactif de mesure de l'activité enzymatique de l'ADN polymérase pUL54 du cytomegalovirus - Apport des modèles théoriques tridimensionnels à l'analyse phénotypique (Article-6)

Introduction

Les mutations de l'ADN polymérase pUL54 associées à des résistances sont généralement localisées dans, ou à proximité, des domaines fonctionnels et peuvent à ce titre avoir des répercussions sur les fonctions de l'enzyme (activités polymérasique et exonucléasique). Des tests biochimiques permettant de mesurer l'activité polymérasique *in vitro* ont été développés au laboratoire de Virologie de Lariboisière. La technique de référence, basée sur la mesure de l'incorporation du dCTP marqué au ^{32}P , dans le brin d'ADN néoformé à partir d'une matrice d'ADN a pour inconvénient majeur de nécessiter l'utilisation de réactifs radioactifs (Oberg 1983; Ye and Huang 1993; Cihlar, Fuller *et al.* 1997; Ducancelle, Gravisse *et al.* 2005). Cet inconvénient a conduit à développer une méthode permettant la mesure de l'activité polymérasique *in vitro* par un test immunoenzymatique. Dans cette optique, un test basé sur l'incorporation de dUTP marqué à la digoxygénine (DIG) a été développé au laboratoire de Lariboisière. La mesure de l'activité polymérasique est réalisée par une méthode sandwich s'appuyant sur un anticorps anti-DIG couplé à la peroxydase. La révélation est effectuée par mesure de la densité optique obtenue après réaction colorimétrique provoquée par l'ajout du substrat de la peroxydase.

Ce test a été validé par mesure de l'activité polymérasique et analyse du phénotype de résistance au foscarnet de la polymérase de souches de référence et de polymérases recombinantes, portant des mutations associées à la résistance au foscarnet : N495K, T700A, V715M et E756K. Ce test a ensuite été utilisé pour étudier le retentissement de mutations inédites détectées chez des isolats cliniques résistants au foscarnet : S771P, A505V et de l'association S291P/K415R.

Notre contribution à ce travail a été d'établir un modèle théorique de la structure tridimensionnelle des domaines catalytiques de la polymérase pUL54 afin d'évaluer l'effet

théorique des mutations sur la structure de la polymérase. Grâce aux outils bioinformatiques couplés aux banques de données internationales, il est possible de rechercher à partir d'une séquence d'acides aminés, des domaines fonctionnels d'une protéine.

Le programme "NCBI Conserved domain Search Service" (CD-Search) permet non seulement de rechercher les domaines fonctionnels, mais aussi d'observer la structure tridimensionnelle théorique de ces derniers par homologie avec des protéines proches de structure connue (Marchler-Bauer and Bryant 2004). CD-Search permet ainsi, à partir d'une séquence soumise via le portail Internet de NCBI, de rechercher dans les banques de données bioinformatiques les domaines fonctionnels connus dont la séquence est homologue à la séquence étudiée. Si la séquence soumise au programme porte plusieurs motifs d'acides aminés homologues à des domaines fonctionnels de séquence et de structure connues, le système fournira l'ensemble des alignements qu'il aura effectué et rend possible l'accès direct au fichier PDB de la structure de référence ainsi qu'à toutes les informations relatives aux séquences proposées dans l'alignement (liens directs avec les données de la GenBank). L'utilisation du logiciel Cn3D, permet ainsi de visualiser ces alignements parallèlement à la structure de référence. Il est alors possible de retrouver des acides aminés d'intérêt sur l'alignement et de localiser leur position théorique dans la structure de référence.

En complément à la mesure de la capacité répliquative, nous avons jugé intéressant d'utiliser les modèles théoriques des domaines fonctionnels de la polymérase obtenus par comparaison avec gp43 du bactériophage RB69 pour tenter de prédire l'effet théorique de l'association de mutations S291P/K415R, d'une part, et des mutations S771P et A505V, d'autre part,

Matériels et méthodes : Développés dans l'article complet ci-après.

Résultats et discussion

Développement et validation du test non radioactif de mesure de l'activité polymérasique :

Dans cette étude est présenté un nouvel outil de caractérisation du phénotype de résistance de la polymérase virale pUL54 pour l'étude des mutations du gène *UL54* susceptibles de conférer une résistance au foscarnet. Cette technique permet de définir la concentration inhibitrice à 50 % (CI50), c'est à dire la concentration de foscarnet nécessaire pour réduire de 50 % l'activité polymérasique.

La technique étudiée est sensible et reproductible. Son application à l'étude de mutations de résistance (dont le rôle a été démontré par transfert de marqueur), a permis de confirmer sa fiabilité. Ainsi, la CI50 de polymérases portant les mutations N495K, T700A, ou V715M était respectivement 8, 10 et 14 fois plus élevée que celle de la polymérase sauvage.

Par ailleurs, l'application de cette technique pour l'étude, d'une part, de l'association de mutations S291P/K415R et, d'autre part, des mutations S291P, K415R, A505V et S771P, a permis de mieux appréhender l'effet de ces mutations. La mutation S771P est associée à une perte complète de l'activité polymérasique. La mutation A505V est associée à une diminution d'un facteur 3 de la sensibilité de la polymérase au foscarnet, avec une conservation de l'activité polymérasique.

Enfin, alors que les mutations S291P ou K415R ne modifient que faiblement la sensibilité au foscarnet, l'association S291P/K415R engendre une diminution d'un facteur 9 de la CI50 de la polymérase suggérant une action combinée des deux mutations sur la réponse au foscarnet. Ne disposant pas de structure tridimensionnelle pour pUL54, nous avons construit des modèles théoriques de la structure tridimensionnelle des sites catalytiques, polymérasique et exonucléasique, afin d'évaluer l'effet des nouvelles mutations sur la structure en complément aux résultats des tests biochimiques.

Construction des modèles théoriques de la structure tridimensionnelle des domaines fonctionnels de pUL54 et application aux mutations S291P/K415R, S771P et A505V :

Afin d'obtenir la structure théorique des différents domaines de la polymérase pUL54, nous avons soumis sa séquence en acides aminés au programme CD-Search (figure 21).

CD-Search propose comme résultats différents alignements et structures correspondant aux différentes régions de pUL54 : partie N-terminale (notée DNA_pol_B_exo), région centrale (notée POLBc) et région C-terminale (notée DNA_POL_B). Le programme fournit un 4^{ème} alignement correspondant à l'ensemble du domaine polymérasique de pUL54 : région centrale et N-terminale (notée PolB). Le logiciel sélectionne pour chaque domaine fonctionnel une structure de référence correspondant à la structure conservée des protéines de cette famille. Ainsi, concernant pUL54, l'ensemble des alignements proposé et toutes les structures de référence correspondent à la polymérase gp43 du bactériophage RB69 (PDB N°**1CLQ_A** et **1WAF_A**).

Cet outil fournit des informations sur l'agencement tridimensionnel théorique des domaines fonctionnels permettant ainsi d'évaluer l'impact théorique de certaines mutations à condition qu'elles soient localisées dans, ou à proximité, des motifs conservés. Par ailleurs, ce programme ne donne un résultat que si les domaines principaux, associés à une activité enzymatique, sont retrouvés avec une grande homologie, ce qui limite le risque d'artefact. CD-Search a cependant comme inconvénient de fractionner la protéine en domaines fonctionnels, si bien que pour appréhender sa structure globale, et en particulier pour étudier les relations entre les motifs de deux domaines différents, il est quelquefois nécessaire d'utiliser plusieurs alignements différents, même si tous s'appuient sur une même référence, ce qui est le cas pour pUL54.

L'analyse de l'alignement correspondant au domaine exonucléasique, nous a ainsi permis de présumer de l'impact de la mutation A505V et de l'association des mutations S291P/K415R sur la structure de ce domaine et donc de leur rôle théorique dans la résistance au foscarnet. Nous avons ainsi montré que l'homologue de l'alanine 505 chez gp43 (S294) était localisé dans une hélice- α constituant le domaine ExoIII. La substitution A505V apparaît être une mutation mineure qui ne devrait pas perturber la structure de ce domaine et devrait, à ce titre, n'avoir que peu d'effet sur la résistance au foscarnet, hormis si ce résidu intervient directement dans le mécanisme de résistance.

Par ailleurs, nous avons montré que la substitution de la sérine S291 par une proline provoquait une torsion à la base du feuillet- β qui constitue le domaine ExoII. Cette torsion pourrait engendrer l'éloignement ou le rapprochement de cette région de l'hélice- α constituant le domaine ExoI contenant le site de substitution K415R (figure 22). Cette substitution pourrait ainsi modifier significativement la structure tridimensionnelle du domaine

exonucléasique. La mesure de la CI50 des souches recombinantes montre que, indépendamment l'une de l'autre, chacune de ces mutations a un effet restreint sur la sensibilité de la polymérase au foscarnet, démontrant un effet combiné des deux mutations. Ceci nous a conduits à émettre une hypothèse quant au mécanisme de la résistance au foscarnet de la polymérase du recombinant portant l'association S291P/K415R. S291P provoquerait un éloignement du feuillet- β du domaine ExoII par rapport à l'hélice- α du domaine ExoI. Cet éloignement seul ne suffirait pas à lever l'inhibition par le foscarnet, mais la substitution K415R pourrait engendrer un phénomène de répulsion entre l'arginine R415 et des acides aminés basiques localisés dans le feuillet- β , R420 et K426 (l'arginine ayant une charge plus importante que la lysine) amplifiant l'effet de S291P.

Enfin, l'analyse du modèle de la structure tridimensionnelle des domaines polymérasiques nous a permis d'étudier l'effet potentiel de la substitution S771P (figure 23). Selon ce modèle, la sérine S771, qui est localisée à l'extrémité N-terminale de la région VI, se situe dans une boucle au bout des doigts de la polymérase. La présence d'une proline à cette position devrait provoquer la constitution d'un coude qui engendrerait la perturbation de la structure de l'extrémité des doigts de la polymérase. Selon ce modèle, cette perturbation, devrait en particulier affecter directement la position des résidus R784, R788 et K811 dont le rôle dans l'activité polymérasique a été démontré (Joyce and Steitz 1995; Gardner and Jack 1999), voire de l'hélice- α constituant la région III qui est impliquée dans la fixation des nucléotides et du foscarnet (Tchesnokov, Gilbert *et al.* 2006). Selon ce modèle et les données de la littérature, cette mutation devrait perturber l'activité de l'enzyme, ce qui est en accord avec les résultats de notre étude montrant la perte de l'activité des polymérases qui portent cette mutation. Cette mutation pourrait en outre être associée à un défaut de fixation du foscarnet, mais la perte d'activité polymérasique est telle qu'elle ne peut pas être considérée comme une mutation de résistance. La présence de cette mutation sur un isolat clinique, pourrait s'expliquer par la compensation des activités polymérasiques, liée à une coinfection par deux souches distinctes.

Cette étude a montré que l'utilisation de modèles théoriques de la structure tridimensionnelle des domaines fonctionnels de pUL54, s'appuyant sur la structure de la polymérase gp43 du phage RB69 que nous avons constitués, permettait d'évaluer l'impact d'une mutation sur la structure du site catalytique. Cet outil, couplé à la mesure de l'activité polymérasique, permet d'évaluer l'effet des mutations sur la résistance et sur la capacité répliquative des souches.

➡ **Article-6**

Development and validation of a non-radioactive DNA polymerase assay to study cytomegalovirus resistance to foscarnet. A. Ducancelle, S. Alain, G. Champier, A. M. Fillet, F. Petit, M. J. Sanson-Le-Pors, and M. C. Mazon. En préparation pour *Journal of Virological methods*.

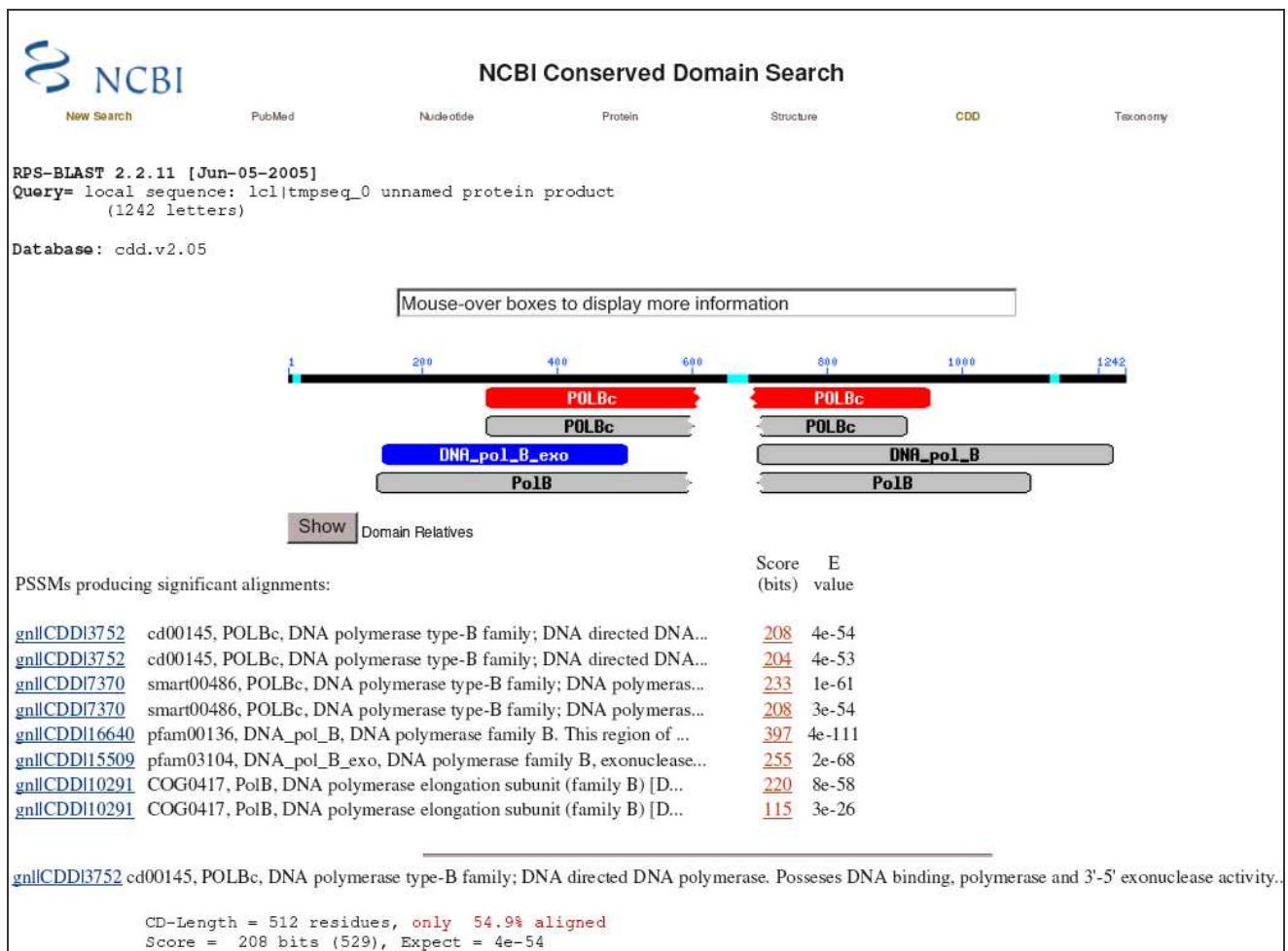


Figure 21 : Résultat de l'analyse des domaines fonctionnels de pUL54 obtenu à l'aide du programme CD-Search (NCBI Conserved Domain Search)

Après soumission de la séquence de pUL54 au programme CD-Search (souche AD169) différents alignements et structures correspondant aux différentes régions de pUL54 sont proposés : partie N-terminale = **DNA_pol_B_exo**, en bleu ; région centrale : **POLBc** en gris ; région C-terminale = **DNA_POL_B** en gris ; région centrale et N-terminale = **PoIB** en gris. L'ensemble des alignements proposés et toutes des structures de références correspondent à la polymérase gp43 du bactériophage RB69 (PDB N°**ICLQ_A** et **IWAF_A**).

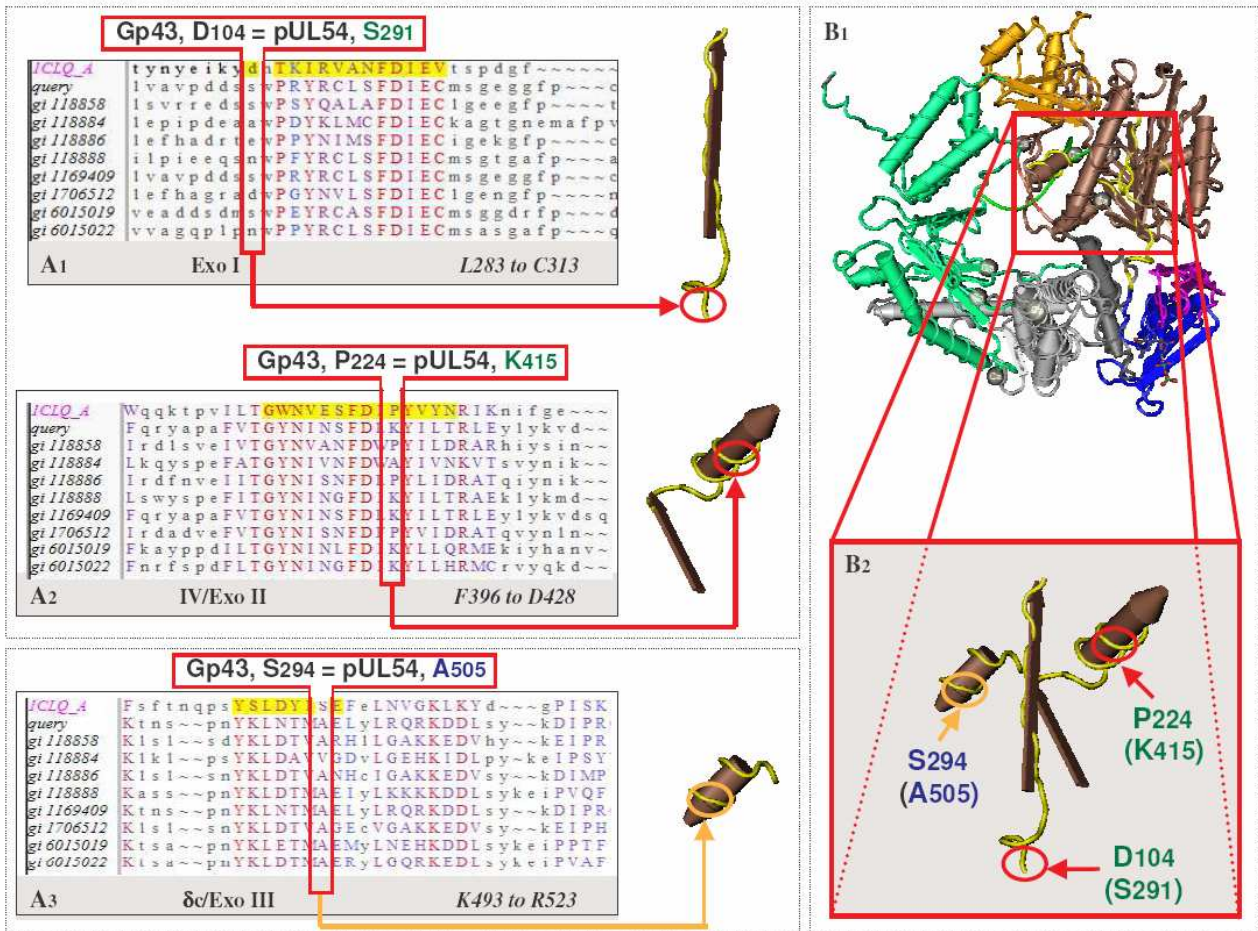


Figure 22 : Effet théorique de l'association des mutations A505V, S291P et K415R

L'analyse de la séquence en acides aminés de la polymérase pUL54 de la souche de référence Towne sur le programme CD-Search de NCBI permet de retrouver les différentes régions constituant le domaine exonuléasique (Domaine fonctionnel répertorié sous la dénomination DNA_Pol_B_exo). A gauche de la figure sont représentés les alignements correspondant aux trois domaines fonctionnels : A1 : domaine ExoI (localisé entre les résidus 283 et 313 ; A2 : domaine ExoII (localisé entre les résidus 396 et 428) ; A3 : domaine ExoIII (localisé entre les résidus 493 et 523). Les encadrés rouges indiquent la localisation des sites de mutation A505V, l'association S291P/K415R et les acides aminés homologues chez la protéine gp43 du phage RB69 (respectivement : S294, D104 et P224). La partie droite de la figure représente la structure tridimensionnelle de la polymérase gp43 (en haut) et un gros plan sur la région où se localisent les résidus S294, D104 et P224 (en bas). L'analyse de ce modèle permet, par homologie avec gp43 et du fait de la conservation de cette structure chez les α -like polymérases, d'évaluer le rôle théorique de chaque mutation. L'homologue de l'alanine A505 est localisé dans une hélice- α et la substitution A505V apparaît être une mutation mineure ne devant pas perturber la structure de la région. La substitution de la sérine S291 par une proline devrait provoquer une torsion à la base du feuillet- β qui constitue le domaine ExoII provoquant ainsi l'éloignement de cette région par rapport à l'hélice- α constituant le domaine ExoI et contenant le site de substitution K415R. La substitution K415R pourrait provoquer une répulsion électrostatique entre le résidu R415 et les résidus R420 et K426 localisés dans le domaine ExoII, amplifiant encore la perturbation de la structure du site.

4- Analyse de l'effet de la mutation N495K sur la résistance au foscarnet et sur l'activité de l'ADN polymérase virale pUL54 (Article-7)

Introduction

Dans une précédente étude, l'analyse de l'émergence et de l'évolution de la résistance du cytomégalo virus aux antiviraux sur quatre isolats séquentiels issus d'un patient atteint de lymphome, avait permis la description d'une nouvelle mutation : N495K (Ducancelle, Belloc *et al.* 2004). Lors d'une seconde étude, la production d'une polymérase recombinante et la détermination du phénotype de cette polymérase avaient révélé que la substitution N495K était associée, *in vitro*, à une baisse de la sensibilité au foscarnet d'un facteur 5 par rapport à la polymérase de la souche de référence Towne (Ducancelle, Gravisse *et al.* 2005). L'objectif de cette seconde étude était de confirmer le rôle de la mutation N495K sur la résistance au foscarnet et de mesurer son impact sur la capacité répliquative du virus recombinant par rapport à la souche de référence.

Matériels et méthodes : Développé dans l'article complet ci-après

Résultats et discussion

Après constitution d'un stock de virus recombinants, obtenus par transfert de marqueur, portant la mutation N495K (rec495), la sensibilité au foscarnet, au cidofovir et au ganciclovir a été déterminée par calcul de la CI50, par rapport à la souche de référence AD169, selon la méthode standard de mesure de la réduction des plages de lyses. Cette analyse a révélé que le virus recombinant rec495 avait conservé sa sensibilité pour le ganciclovir et le cidofovir par rapport à la souche de référence. Au contraire, avec une CI50 de 110 μ M contre 32 μ M pour AD169, soit un IS50 de près de 3,4, la sensibilité de rec495 pour le foscarnet est significativement diminuée par rapport à la souche de référence. La comparaison de la capacité répliquative du recombinant rec495 par rapport à AD169, ne révèle pas de différence quant au délai d'apparition des foyers d'effet cytopathique, à leur nombre et à leur taille.

Seule une baisse du titre viral, d'un facteur 2 à 2,5, a été mise en évidence entre le 3^{ème} et le 6^{ème} jour de l'infection.

Ainsi, il apparaît, que la mutation N495K est associée à une baisse de la sensibilité pour le foscarnet et à un faible impact sur la capacité répliquative de la souche. Aussi, la mutation N495K peut-elle être considérée comme une mutation de résistance au foscarnet, et devra désormais être recherché sur les souches cliniques des patients ne répondant plus à ce traitement.

➡ Article-7

Novel mutation in the UL54 gene of human cytomegalovirus isolates conferring resistance to foscarnet. A. Ducancelle, G. Champier, S. Alain, F. F. Petit, M. J. Sanson-Le-Pors, and M. C. Mazon. *Antiviral Therapy*. En Presse.

Application des modèles théoriques de la structure des domaines fonctionnels de pUL54 à l'étude de la mutation N495K :

Nous avons appliqué les modèles théoriques établis dans l'étude précédente afin d'évaluer le mécanisme de la résistance associée à la mutation N495K. L'asparagine N495 de pUL54 est un résidu non conservé localisé à l'extrémité N-terminale du domaine ExoIII. L'alignement effectué par le programme CD-Search montre qu'il s'agit de l'homologue du résidu F282 de gp43. Ce résidu est localisé à l'extrémité C-terminale d'une hélice- α elle-même située à la périphérie du domaine exonucléasique (figure 24). Ainsi, la mutation N495K ne semble pas avoir d'effet direct sur le domaine exonucléasique. Cependant, une analyse approfondie de la structure de gp43 montre que cette hélices- α est à proximité immédiate de l'hélice- α constituant la région III du domaine polymérasique. Afin d'analyser l'interaction théorique entre les résidus formant les deux hélice- α (du domaine ExoIII et de la région III), deux des structures de gp43 proposées par CD-Search correspondant respectivement aux alignements des domaines exonucléasiques et polymérasiques sont nécessaires. Chacun des alignements permet d'obtenir la correspondance des acides aminés localisés dans les domaines respectifs. En compilant les données de l'alignement des acides aminés formant le domaine exonucléasique (figure 24A) et l'alignement des acides aminés formant la région III du

domaine polymérasique (figure 24B), nous pouvons observer que N495 de pUL54 est l'homologue de F282 de gp43 et qu'il est à proximité des résidus R559 et K560 de l'hélice- α formant la région III. Ces deux acides aminés sont les homologues des résidus L810 et K811 (qui est un résidu invariant chez les polymérasases B) de la polymérase pUL54 (figure 24B). Aussi, en considérant la conservation de la structure des polymérasases- α et l'homologie de gp43 et pUL54, la substitution N495K pourrait-elle provoquer une répulsion électrostatique entre la lysine K495 et la lysine invariante K811 de l'hélice- α constituant la région III (hélice P) (figure 24C). Or, la région III appartient aux doigts de la polymérase qui est une région connue pour intervenir dans l'interaction avec le foscarnet. La répulsion entre la lysine 495 et la lysine 811 pourrait aboutir à une perturbation de la structure des doigts de la polymérase expliquant une diminution de l'affinité pour le foscarnet et donc la baisse de la sensibilité de la polymérase pour cette molécule. Les doigts de la polymérase étant impliqués dans l'activité polymérasique, il n'est pas étonnant que la mutation soit également associée à une perturbation de l'activité polymérasique expliquant la légère diminution de la capacité répliquative.

Ainsi, l'utilisation du programme CD-Search et du logiciel Cn3D nous a-t-elle permis d'appréhender l'impact de la mutation N495K sur la structure des domaines de la polymérase ; toutefois ce système s'appuie sur des modèles théoriques et seule la structure de pUL54 permettra de définir l'impact réel des différentes mutations.

Figure 24 : Effet théorique de la mutation N495K

(A) L'alignement proposé par le programme CD-Search concernant les domaines exonucléasiques (DNA_pol_B_exo) montre que l'asparagine N495 de la polymérase pUL54 est l'homologue de la phénylalanine F282 de la polymérase gp43 du phage RB69 ; l'analyse de la structure de RB69 montre que ce résidu est localisé à l'extrémité d'une hélice- α elle-même à proximité de 2 résidus localisés dans l'hélice- α formant la région III des doigts de la polymérase : R559 et K560. (B) : L'alignement correspondant aux domaines polymérasiques (POLBc) montre que les résidus R559 et K560 de gp43 sont les homologues des résidus L810 et K811 de la polymérase pUL54. (C) : la compilation de ces données et l'analyse des structures montrent que la substitution N495K pourrait provoquer une répulsion électrostatique entre les deux résidus basiques K495 et K811. Cette répulsion pourrait être à l'origine d'une perturbation de la structure des doigts de la polymérase expliquant la baisse d'affinité pour le foscarnet et la légère diminution de la capacité répliquative.

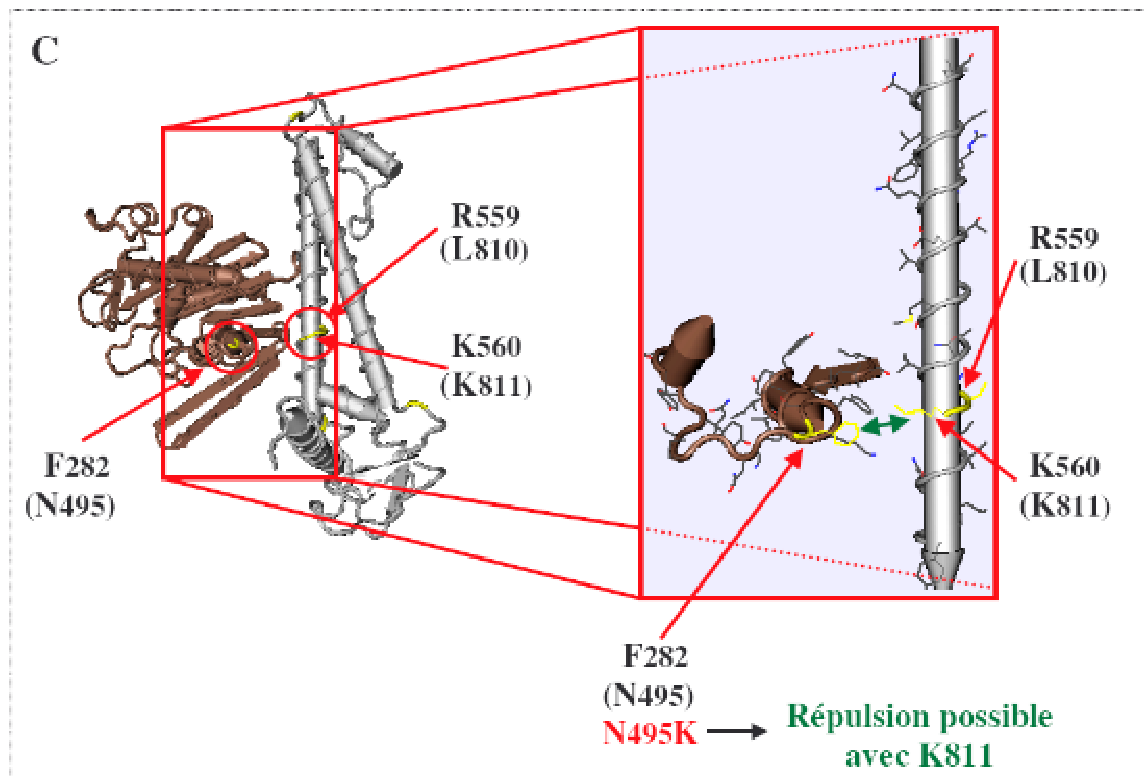
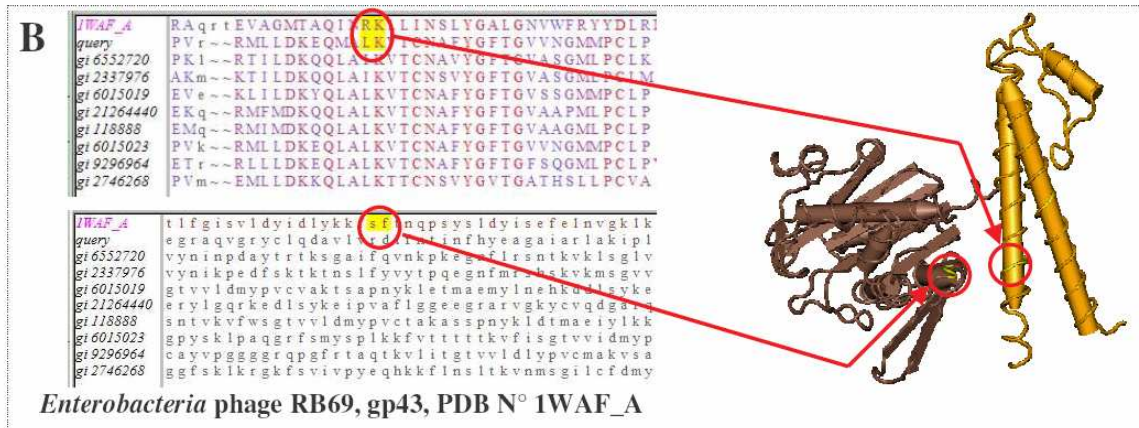
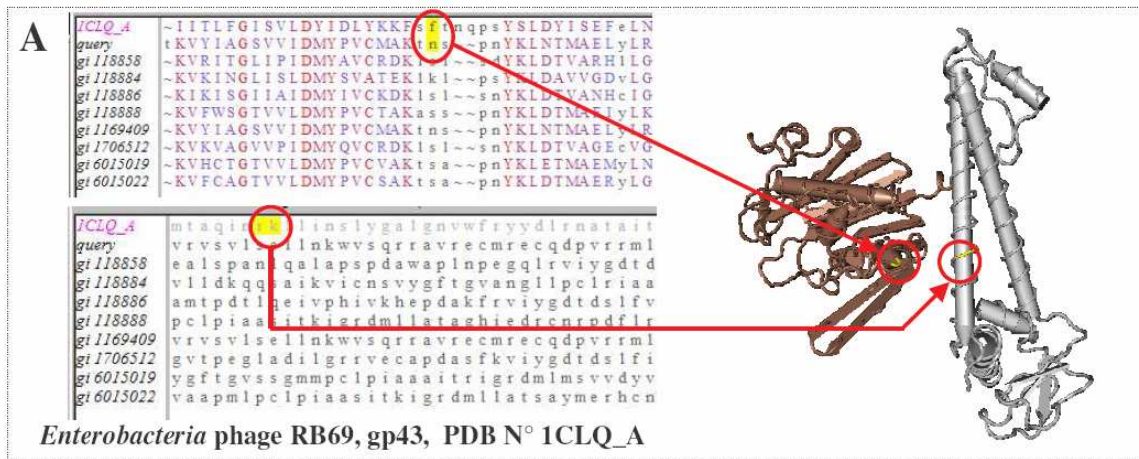


Figure 24 : Effet théorique de la mutation N495K

III- Etude du polymorphisme naturel et analyse fonctionnelle des cibles des dérivés benzimidazolés : pUL56, pUL89 et pUL104, d'une part, et pUL27 d'autre part

Plusieurs études ont montré que les benzimidazoles D-ribonucléosides inhibent efficacement l'encapsidation de l'ADN dans les capsides néoformées par un mécanisme encore inconnu. Il s'agit du 2-bromo-5,6-dichloro-1-(β -D-ribofuranosyl) benzimidazole (BDCRB), son 2-chloro analogue : le 2,5,6-trichloro-1-(β -D-ribofuranosyl) benzimidazole (TCRB) (Townsend, Devivar *et al.* 1995), le 4,5,6-tetrachloro-1-(2,3,5-tri-O-acetyl- β -D-ribofuranosyl) benzimidazole (Cl4RB) (Underwood, Harvey *et al.* 1998) et le 2-chloro-5,6-dimethyl-(1- β -d-ribofuranosyl) benzimidazole (CDMRB) (Dittmer, Drach *et al.* 2005). L'encapsidation est assurée par un ensemble de protéines intervenant au niveau du complexe d'encapsidation, dont les terminases pUL56 et pUL89 et la protéine portail pUL104, au sein desquelles des mutations de résistance ont été décrites.

Un autre benzimidazole ribonucléoside, le maribavir, 2-isopropylamino-5,6-dichloro-1-(β -L-ribofuranosyl)benzimidazole, dérivé lévogyre du BDCRB, inhibe spécifiquement l'activité kinase de la phosphotransférase pUL97, ciblant ainsi l'exportation extranucléaire des capsides. Des mutations de résistance au maribavir ont été décrites au sein de pUL97 mais aussi de pUL27, suggérant l'intervention de cette protéine dans le mécanisme d'action du maribavir (Komazin, Ptak *et al.* 2003; Chou, Marousek *et al.* 2004).

L'objectif de ce travail était, d'une part, de développer des outils pouvant être utilisés pour étudier l'émergence des résistances, une fois ces molécules administrées en pratique clinique pour la prévention et le traitement curatif des infections à CMV, d'autre part, de mettre à profit ces techniques pour mieux comprendre le mécanisme d'action de ces nouvelles molécules et la fonction des protéines cibles par analyse du polymorphisme naturel et de la conservation inter-espèces de chacune de ces nouvelles cibles.

1- Analyse du polymorphisme naturel et de la structure primaire de la protéine d'encapsidation pUL56 ; étude du rôle du doigt de zinc N-terminal dans la fonction de la protéine et dans le mécanisme d'action des dérivés benzimidazolés D-ribonucléosidiques (Article-8)

Introduction

La protéine pUL56 intervient dans le clivage des concatémères de génome viral synthétisés au cours de la réplication. Elle reconnaît les signaux de clivage : séquence *pac*, s'associe à la terminase pUL89, catalyse l'hydrolyse de l'ATP générant l'énergie nécessaire à la translocation de l'ADN viral et participe au clivage en unités de génome qui sont alors insérées dans la capsidie néoformée. Malgré l'importance de telles données pour le développement de nouveaux antiviraux et la prédiction des résistances, les domaines fonctionnels de pUL56, ainsi que le mode précis d'interaction avec les autres terminases et avec les dérivés benzimidazolés, étaient encore peu connus au début de notre étude.

Nous nous étions ainsi fixés comme objectif d'identifier les domaines fonctionnels et les régions variables de la protéine, à partir de l'étude de son polymorphisme naturel, par séquençage de la totalité du gène et identification puis analyse de la structure primaire des régions conservées.

Nous avons donc développé une méthode de séquençage complet du gène *UL56* sur le modèle des méthodes de génotypage de *UL97* et *UL54*, afin de pouvoir les utiliser directement pour le génotypage de souches issues de prélèvements cliniques. Puis, nous avons appliqué cette méthode à l'étude des quatre souches de référence, et de 41 isolats et prélèvements cliniques issus de patients naïfs de tout traitement et de provenance variée. Enfin, la troisième étape de notre travail était d'étudier la conservation inter-espèces de la protéine pUL56, par alignement de sa séquence en acides aminés avec celles d'homologues chez 9 herpèsvirus humains et animaux. Une région contenant la mutation Q204R de résistance au BDCRB et au TCRB et un potentiel motif en doigt de zinc ont particulièrement retenu notre attention.

Matériels et méthodes : Développés dans l'article complet ci-après

Résultats et discussion

L'étude du polymorphisme naturel de pUL56 a révélé que la protéine apparaissait très conservée avec un taux d'homologie entre les souches étudiées de 99,5 %. Nous avons décrit 36 polymorphismes dont trois délétions (tableau 7). L'analyse de ces polymorphismes nous a permis de décrire deux régions variables dans la partie centrale (baptisée pUL56{425-485}) et dans l'extrémité C-terminale de pUL56 (pUL56{778-850}).

Par alignement de la séquence de pUL56 avec celle de 9 homologues chez des herpesvirus humains et animaux, nous avons décrit 12 régions conservées, dénommées régions conservées I à XII.

La présence du site de résistance au BDCRB et au TCRB (Q204R) et d'un potentiel motif en doigt de zinc dans la région conservée IV (résidus C191 à I220) nous a conduits à étudier plus précisément cette région. Nous avons ainsi montré que la région conservée IV, que nous avons baptisée pUL56-ZF, pour "*pUL56 zinc finger*", était l'homologue de la protéine gp49 du bactériophage T4. Cette protéine de 87 résidus acides aminés est une endonucléase de la famille des *DNA junction resolvases*, impliquée dans l'encapsidation de l'ADN chez le bactériophage. Par analyse comparative de la séquence de gp49 et de pUL56-ZF nous suggérons que le doigt de zinc de pUL56 constitue le site de dimérisation de pUL56 (illustré par la figure 25 complémentaire à celles figurant dans la publication). Nous émettons l'hypothèse selon laquelle la dimérisation de deux domaines pUL56-ZFs issus de deux monomères de pUL56 constitue le site de reconnaissance et de fixation des séquences *pac* et le domaine catalytique endonucléasique du complexe d'encapsidation; cette activité impliquerait un cluster d'acides aminés acides (₂₃₉DLLD₂₄₂) contenant l'aspartate catalytique. Enfin, nous suggérons que **pUL56-ZF constitue un site d'action des dérivés benzimidazolés dextrogyres, qui cibleraient ainsi directement la reconnaissance des séquences *pac* et le clivage de l'ADN.**

L'analyse de la partie C terminale de pUL56 nous a conduits à suggérer la présence de deux fragments dont la séquence pouvait correspondre à des leucines zippers. Le premier, noté pUL56-LZ1, est une hélice- α localisée en amont de la proline P728. Il contient les leucines L702, L704, L708, L717, L722 et L726 (illustrées par la figure 26 complémentaire à celles figurant dans la publication). La disposition symétrique de ces leucines rappelle la structure de leucines zippers impliqués dans des processus de repliements internes de protéines ou dans des processus d'interaction protéine/protéine. Le deuxième leucine zipper potentiel, noté pUL56-LZ2, est une hélice- α localisée entre les prolines P741 et P767. Il

implique les leucines L742, L744, L756, L760 et L764 qui sont, à l'instar de pUL56-LZ1, disposées de part et d'autre de l'axe de l'hélice.

Ainsi les domaines pUL56-LZ-1 et pUL56-LZ-2 pourraient être impliqués dans la constitution de repliements internes de la protéine et/ou dans des processus d'interaction protéine/protéine.

Cette analyse de la conservation intra- et inter-espèces de pUL56 nous a permis d'identifier différents domaines fonctionnels de pUL56 et, grâce à l'analyse de leur structure primaire, d'émettre des hypothèses quant à leur fonction. Cette étude a, par ailleurs, permis de mieux comprendre la fonction théorique de pUL56 puisque nous avons identifié le domaine catalytique endonucléasique potentiel et certains résidus importants pour cette activité. Ces hypothèses nécessitent toutefois d'être vérifiées par des expérimentations et par des études structurales.

➡ Article-8

Genetic and primary structure analysis of human cytomegalovirus pUL56 packaging protein: role of the N-terminus zinc finger in the benzimidazole D-ribonucleoside mechanism of action. G. Champier, A. Couvreur, A. Rametti, M. C. Mazon, S. Bouaziz, F. Denis, and S. Alain. Soumis à *Virology*, Avril 2006.

Polymorphisme	Présent sur les souches de Référence
E2K	–
V12L	–
V162I	–
D242G	–
A327V	–
E393K	–
A425V	–
G436E	–
M442T	–
A444G	–
S445N	–
Del SNS 445–447	–
Del N446	–
Del NSS 446–448	–
T452I	Davis
S454N	–
G460V	–
A464T	–

Polymorphisme	Présent sur les souches de Référence
V771A	Towne
V476A	Towne
E485G	–
R507C	Davis/Toledo
Q577R	–
D586N	Davis
A648R	–
A648S	Davis/Toledo
L658F	–
S749N	–
V778A	Towne/Davis
V793A	Towne/Davis
P800L	–
P803A	–
A812E	–
L831M	–
G840A	–
S848N	–

*Tableau 7 : Polymorphisme naturel de la protéine pUL56
La séquence de référence est celle de la souche AD169, PDB N° CAA35371*

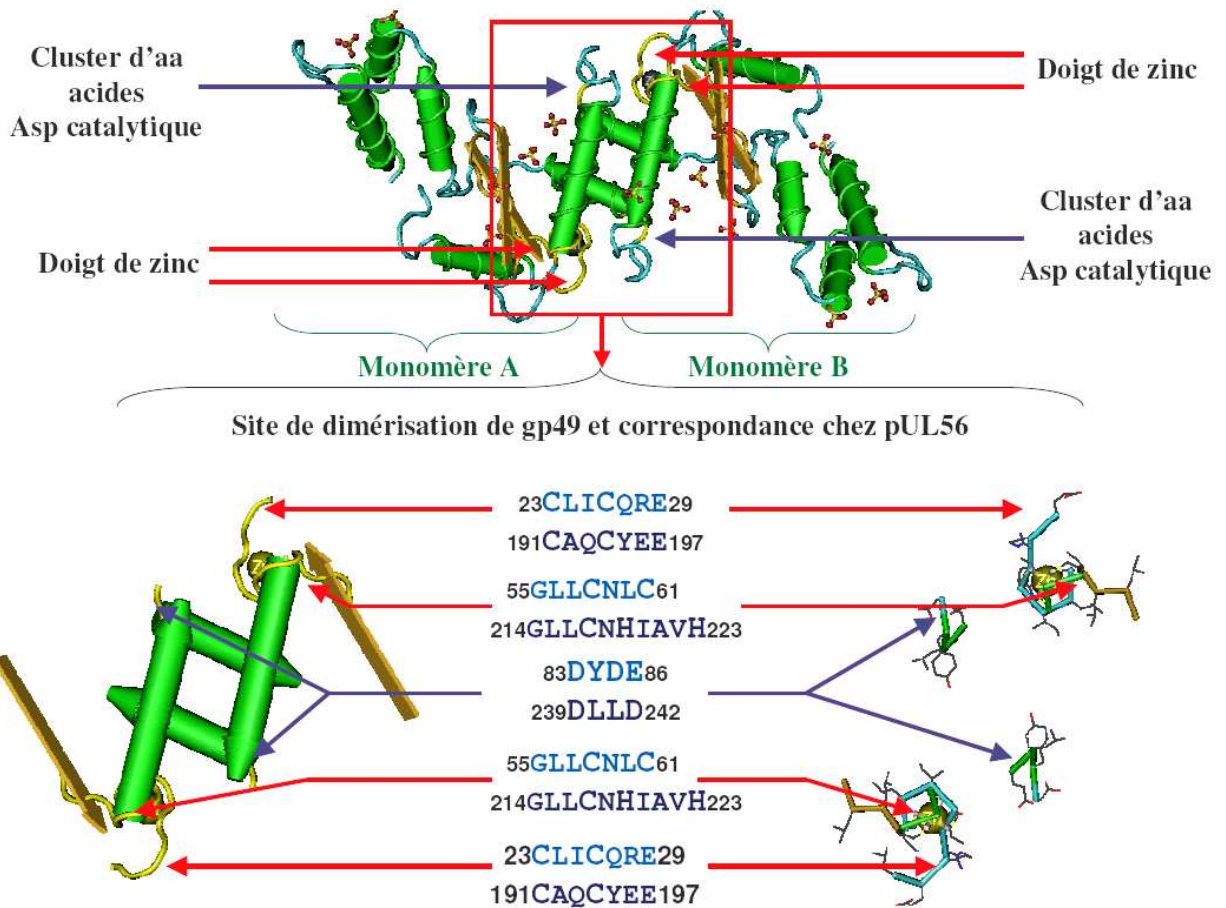


Figure 25 : Site de dimérisation et domaine catalytique de la protéine d'encapsidation gp49 du phage T4

Deux monomères de gp49 se dimérisent de façon antiparallèle au niveau de leur doigt de zinc constituant le domaine catalytique endonucléasique (en haut). En bas se trouve représentée la disposition dans l'espace des acides aminés de gp49 impliqués dans la constitution du doigt de zinc et la correspondance chez pUL56-ZF.

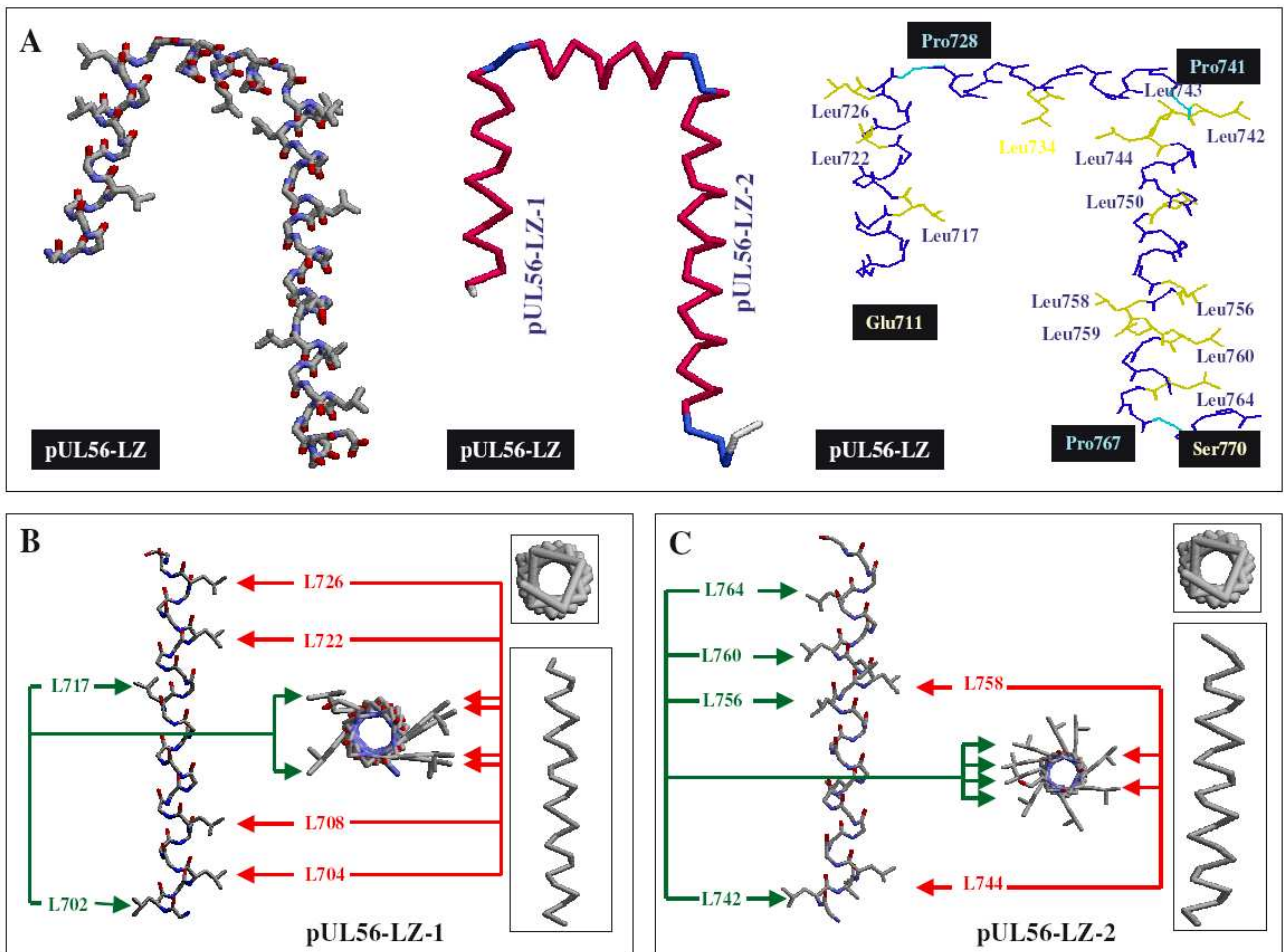


Figure 26 : Analyse du domaine pUL56-LZ (pUL56 Leucine zipper)

A : La structure théorique de la région C-terminale de pUL56 supposée contenir un leucine zipper a été construite grâce au logiciel Insight 98.0, Accelrys. Ce modèle révèle la possibilité de formation, entre les résidus L702 et S770, de 3 hélices- α potentielles délimitées par 3 résidus prolines : P728, P741 et P767. L'hélice- α localisée entre les prolines P728 et P741 contient une seule leucine et ne peut, à ce titre, constituer un leucine zipper. Au contraire les hélices- α localisées en amont de la proline P728 et entre P741 et P767 contiennent plusieurs leucines distribuées suffisamment régulièrement pour constituer des leucines zippers.

B : Représentation dans l'espace de l'hélice- α localisée en amont de P728, notée pUL56-LZ1. A noter la disposition symétrique particulière des leucines L702 et L717 d'une part et L704, L708, L722 et L726 d'autre part, respectivement localisées de part et d'autre de l'axe de l'hélice.

C : Représentation dans l'espace de l'hélice- α localisée entre P741 et P767, notée pUL56-LZ2. Le modèle théorique montre que les leucines L742, L744, L756, L760 et L764, situées dans cette hélice sont disposées de part et d'autre de l'axe mais avec une disposition moins symétrique que pour pUL56-LZ1.

Analyse structurale de pUL56-ZF :

A la suite de cette étude, nous avons cherché à vérifier ces hypothèses en analysant le peptide pUL56-ZF par RMN (résonance magnétique nucléaire) en collaboration avec l'Institut de Pharmacologie Chimique et Génétique de l'Université Paris V dans le cadre du Master 2 d'Anthony Couvreur. Cette analyse se décompose en deux phases : tout d'abord, une étude structurale préliminaire à l'aide de diverses techniques de spectroscopie, puis une analyse de la structure "réelle" en RMN à partir d'un peptide synthétisé.

Un peptide pUL56-ZF synthétique (résidu 183 à 233) a été produit afin de déterminer sa structure tridimensionnelle grâce à diverses expériences de RMN du proton (CASYS, NOESY et TOCSY). L'attribution des déplacements chimiques et l'estimation des distances entre les protons permettent de reconstituer la structure du peptide. Cette analyse nécessite un haut degré de pureté de l'échantillon (supérieure à 95 %), une concentration importante (de l'ordre du millimolaire) et une solubilité totale. Les études préliminaires, réalisées à partir du peptide synthétique, n'ont pas permis de déterminer les conditions de solubilisation à pH neutre, rendant impossible l'étude de sa conformation.

Aussi, nous sommes-nous appuyés sur d'autres méthodes basées sur des techniques de spectroscopies optiques afin d'évaluer le comportement de pUL56-ZF en présence de Zn^{2+} et d'estimer ses conditions de structuration.

Analyse du spectre de fluorescence de Y195 de pUL56-ZF

La présence d'une tyrosine (Y195) dans le peptide pUL56-ZF a été mise à profit pour évaluer l'influence de la concentration en Zn^{2+} du pH et d'un agent réducteur (2,3-dithiothréitol, DTT) sur la structuration du doigt de zinc potentiel. Ce résidu est en effet localisé à proximité des cystéines C191 et C194 potentiellement impliquées dans la chélation de zinc II. L'intensité de la fluorescence de Y195 constitue un marqueur du degré de structuration du peptide et rend possible l'évaluation de l'influence de certains paramètres, sur cette structuration, par mesure de l'intensité de la fluorescence à 360 nm. Ainsi, avons-nous entrepris de tester l'influence du pH d'une part et de l'ajout de DTT d'autre part. Dans un premier temps, nous avons observé que la structuration du peptide n'est rendue possible qu'au delà de pH 6 en présence de DTT (figure 27A). En effet, l'intensité de la fluorescence de Y195 évolue progressivement jusqu'à atteindre un plateau autour de 0,5 équivalent de Zinc II par peptide. Cependant, à pH 5,5 (condition de solubilité optimale) nous n'avons observé

aucune augmentation du signal de fluorescence. Ceci explique les résultats obtenus en RMN concernant l'absence de signaux caractéristiques des structures secondaires et tertiaires.

Dans un deuxième temps nous avons testé sur la même gamme de pH l'influence du DTT (figure 27A). Ceci a révélé que, quelque soit le pH, l'absence du DTT ne permet pas la structuration du peptide suggérant que cette dernière implique bien des cystéines, puisque le rôle du DTT est d'empêcher la formation des ponts dissulfures.

L'effet du DTT confirme le rôle des cystéines et du zinc dans la structuration du peptide, tendant à démontrer que ce dernier a bien la capacité de former un doigt de zinc.

Analyse du spectre d'absorption UV/Visible de pUL56-ZF

Le mode de coordination et la nature des résidus impliqués ont été déterminés par spectroscopie d'absorption UV/visible en observant les différentes bandes de transition électronique du cobalt (II) couramment utilisé pour l'étude de doigt de zinc (figure 27C). Jusqu'à 0,5 équivalent, l'analyse révèle la présence d'une bande de transition à 310 nm avec épaulement à 330 nm caractéristique de la chélation du cobalt (II), correspondant à un don d'électrons du ligand au métal, et des bandes à 600, 650 et 700 nm qui sont la signature d'une coordination du métal en géométrie tétraédrique. Par ailleurs, le mode de coordination se modifie à partir de 0,5 équivalent, montrant que la géométrie du sous-système métal/ligands change à partir de cette valeur.

Analyse du spectre de dichroïsme circulaire de pUL56-ZF

La présence de structure secondaire de type hélices- α et feuillets- β a été analysée grâce à la spectroscopie de dichroïsme circulaire (figure 27D). Cette analyse, réalisée en fonction de la concentration en ZnCl_2 , révèle, jusqu'à 1 équivalent de Zn^{2+} , la présence sur le spectre d'une bande d'absorption à 210 nm avec épaulement à 225 nm, caractéristique des hélices- α . Cette analyse montre aussi que les hélices- α à l'origine de cette bande d'absorption sont proches du site de chélation du zinc : le niveau d'absorption est en effet dépendant de la concentration en ZnCl_2 . La formation de ce type d'éléments structuraux peut aider à la chélation du métal et donc à la constitution du doigt de zinc.

Ces différentes techniques de spectroscopie ont permis de démontrer que la structuration de pUL56-ZF était sensible à l'ajout d'ions Zn^{2+} ce qui permet d'envisager la formation d'un doigt de zinc. De plus, en fluorescence et en UV/visible, nous avons montré que la structuration de pUL56-ZF exigeait des conditions de pH proches des pK_A des histidines et

des cystéines qui lient potentiellement le zinc (pH 7,5). Par ailleurs, l'analyse du spectre d'absorption UV/visible confirme l'existence d'une chélation à géométrie tétraédrique par des résidus cystéines et histidines. La spectroscopie de dichroïsme circulaire révèle la formation d'hélices- α jusqu'à 1 équivalent de Zn^{2+} , démontrant qu'un seul doigt de zinc est formé. Cependant, l'analyse des spectres de fluorométrie et d'UV/visible indique, quant à elle, une valeur de 0,5 équivalent traduit soit que le zinc est partagé par deux peptides, mais ce cas n'a jamais été décrit, soit que le peptide est instable.

Par ailleurs, ces techniques révèlent que les différentes régions du peptide subissent différemment l'influence du zinc. En effet, la tyrosine 195 et les résidus alentour adoptent leur géométrie d'équilibre dès 0,5 équivalent de zinc tandis que les hélices sont formées définitivement à 1 équivalent et sont faiblement représentées quand la concentration en zinc est moindre. Enfin, même si les cystéines restent à la base de la fixation du zinc, le mode de coordination change à partir de 0,5 équivalent. La cause de ce phénomène, qui peut être une dimérisation de pUL56-ZF ou un manque de stabilité du segment synthétisé, ne pourra être vérifiée que par des expérimentations plus poussées.

Ces résultats préliminaires tendent à confirmer que pUL56-ZF constitue bien un doigt de zinc et nous a donc conduits à poursuivre nos investigations afin, à terme, de déterminer la structure tertiaire de ce domaine, de vérifier sa capacité à se dimériser et à lier les séquences *pac*, les dérivés benzimidazolés dextrogyres, et/ou d'autres partenaires protéiques et afin d'identifier les résidus importants pour la structuration et la fonction de pUL56-ZF. L'ensemble de ces expérimentations nécessite de disposer de pUL56-ZF en grande quantité (de l'ordre du mg) et à un haut niveau de pureté, ce que ne permettent pas d'obtenir les techniques classiques de synthèse chimique. Aussi, nous sommes-nous fixés comme objectif de développer un protocole de production du peptide pUL56-ZF afin de pouvoir réaliser ces analyses supplémentaires. Ce protocole doit pouvoir s'adapter à la production de peptides portant des mutations diverses permettant d'identifier les résidus importants pour la structure et pour la fonction du domaine pUL56-ZF. Une fois validé, ce protocole pourra aussi être utilisé pour produire ces mêmes peptides avec marquage ^{15}N et ^{13}C dans le cadre d'études RMN plus poussées.

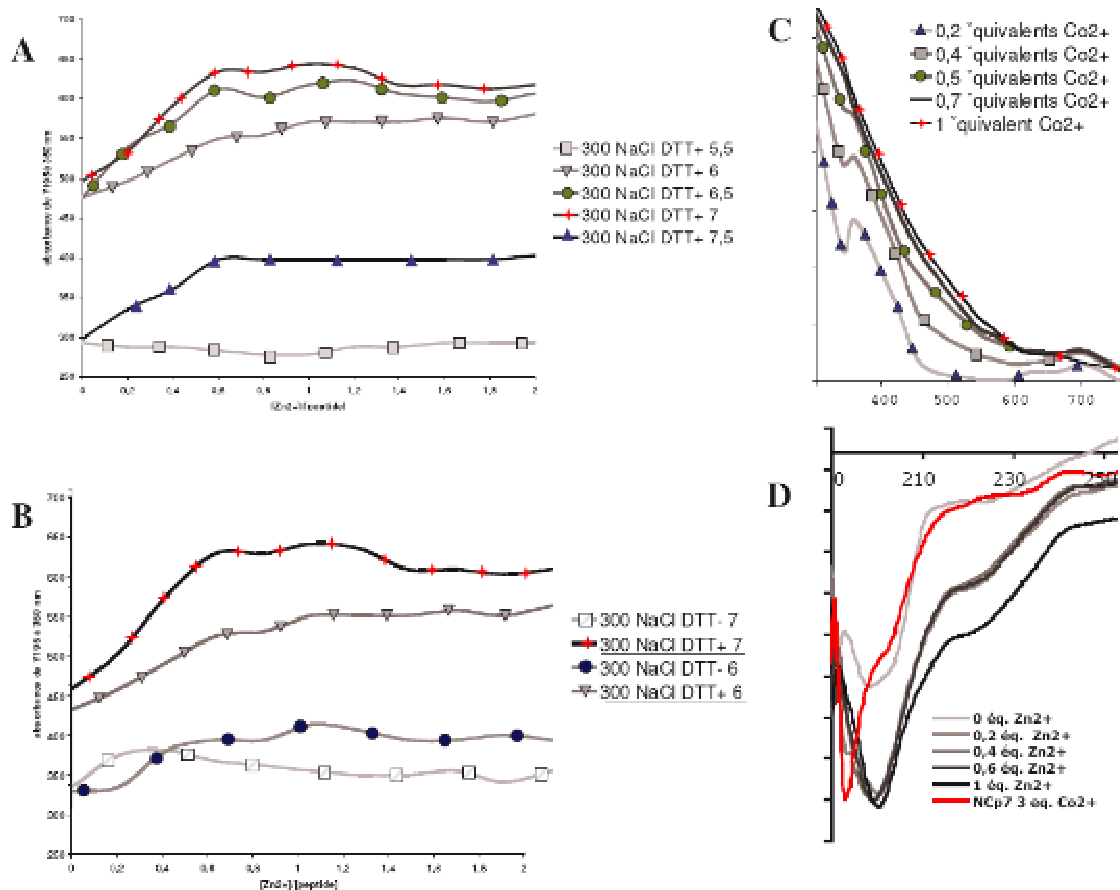


Figure 27 : Analyse structurale du peptide pUL56-ZF

A : Influence du zinc et du pH sur la structuration de pUL56-ZF synthétique : le peptide a été solubilisé en présence de DTT dans des solutions de pH croissant (5,5 ; 6 ; 6,5 ; 7 et 7,5) puis la fluorescence émise à 360 nm par la tyrosine Y195 a été mesurée en fonction de la concentration en Zn^{2+} ; hormis à pH 5,5, l'intensité de la fluorescence de Y195 varie significativement en fonction de la concentration en Zn^{2+} démontrant une influence du zinc sur la fluorescence et donc sur la structuration du peptide. L'augmentation de la pente des courbes entre les pH 6, 6,5 et 7 révèle que l'effet du zinc sur la fluorescence est d'autant plus grand que le pH est élevé ce qui montre que la structuration est aussi influencée par le pH.

B : Influence du DTT sur la structuration de pUL56-ZF : en l'absence de DTT à pH 6 et 7 (300 NaCl DTT-6 et 300 NaCl DTT-7) l'intensité de la fluorescence de Y195 ne varie pas en fonction de la concentration en Zn^{2+} , contrairement aux échantillons contenant le DTT (300 NaCl DTT+6 et 300 NaCl DTT+7) ; aucun effet du DTT n'a été observé à pH 5,5 et l'effet est limité à pH 7,5.

C : L'analyse du spectre d'absorption UV/visible de pUL56-ZF en fonction de la concentration en ions divalents (Co^{2+}) permet de calculer qu'un seul ion est fixé par le doigt de zinc. L'étude du spectre montre, jusqu'à 0,5 équivalent de Co^{2+} , la présence d'un pic d'absorption à 310 nm avec épaulement à 350 nm caractéristique de la chélation du zinc par don d'électron de la cystéine vers le métal. Les bandes de transition à 600, 650 et 700 nm sont caractéristiques d'une géométrie tétraédrique. L'absence des bandes de transition au-delà de 3,5 équivalents traduit un changement de mode de coordination.

D : Analyse de pUL56-ZF par spectroscopie de dichroïsme circulaire : jusqu'à 1 équivalent l'ajout de Zn^{2+} se traduit par la présence sur le spectre d'une bande d'absorption à 210 avec épaulement à 225 nm. Ce profil d'absorption constitue la signature de structures de type hélice- α . La variation de l'absorption en fonction de la concentration en $ZnCl_2$ montre que les hélices à l'origine de ces bandes sont à proximité du site de fixation du Zn^{2+} . L'expérience a été réalisée en parallèle sur un témoin négatif ne contenant pas ce type de structure secondaire : fraction de la protéine NCP7 de la nucléocapside du VIH contenant un doigt de zinc (NCP7¹⁻³⁰).

Production in vitro de pUL56-ZF :

Dans un premier temps, nous avons cloné la séquence codante de pUL56-ZF (entre les codons 183 et 233) dans le vecteur d'expression pRSETB commercialisé par Invitrogen (pRSET A, B, C Protein Expression System).

Ce vecteur a pour intérêt de disposer d'un promoteur T7 fort, et d'une séquence RBS (*ribosome binding site*) de taille variable du fait de la présence de plusieurs codons initiateurs en phase le rendant utilisable dans la plupart des modèles (*E. Coli*, baculovirus, levures et cellules de mammifère). Par ailleurs, ce vecteur permet de produire les peptides en y intégrant deux tags. Le premier tag est une queue polyhistidine qui permet la purification du peptide recombinant sur résine par chromatographie. Le second est un fragment protéique constituant un site antigénique spécifique de l'anticorps AntiXpress (Invitrogen) permettant la détection du peptide par western blot (figure 28A).

Clonage de la séquence codante de pUL56-ZF dans pRSETB

Les inserts ont été préparés par réaction de polymérisation en chaîne avec incorporation des sites de restriction BamHI en 5' et EcoRI en 3' à l'aide des amorces *pUL56-ZF-BamHI-sens* (5'-gCATGCATCgAATTCGgTCgAAgggACgACATgC-3') et *pUL56-ZF-EcoRI-rev* (5'-gCATgCATCgAATTCggTTAgATATTCACATCggA-3') au sein de laquelle nous avons pris soin d'introduire un codon stop. La réaction d'amplification a été réalisée avec la polymérase *Taq High Fidelity™*, Roche Boehringer, selon les recommandations du fabricant. Après digestion des inserts et du plasmide avec un mélange d'enzymes EcoRI et BamHI (Invitrogen), déphosphorylation du plasmide digéré avec la phosphatase alcaline (Promega), les clonages ont été réalisés à l'aide de l'enzyme T4 Ligase (Promega), avec deux rapports de ligature (3:1 et 1:1). L'ensemble de ces étapes a été effectué selon les recommandations des fabricants. Le produit de ligature est utilisé pour transformer des cellules TOP10F' (Invitrogen) rendues compétentes par un traitement au CaCl₂ (protocole présenté en annexe).

Afin de sélectionner les clones portant l'insert, une PCR de criblage a été réalisée directement à partir des colonies bactériennes, grâce aux amorces T7-prom et T7-rev localisées sur le plasmide de part et d'autre du site multiple de clonage. La PCR a été réalisée à l'aide de la *Taq* polymérase Qiagen, selon les recommandations du fabricant, sur 10µL d'eau dans lesquels ont été incorporées des bactéries directement à partir des colonies. L'ADN plasmidique des clones positifs a été purifié sur colonne grâce au kit Wizard SV-Plus DNA purification Kit (Promega) après culture, durant 12 h à 37°C, des clones sur 10 mL de bouillon

BHI additionné d'ampicilline Amp 100 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ (composition présentée en annexe). L'orientation et la séquence de l'insert ont été vérifiées par séquençage des plasmides purifiés.

Production in vitro de pUL56-ZF

Toutes les étapes de préculture et de culture sont réalisées à 37°C en bouillons ou sur milieux pauvres (bouillon SOB) selon les recommandations du fournisseur du plasmide d'expression. Afin d'augmenter la probabilité d'expression du peptide pUL56-ZF deux clones contenant l'insert en phase avec les différents tags (notés pUL56-ZF- α 1 et pUL56-ZF- α 10) ont été mis en culture 3 h sur 10 mL de bouillon puis repiqués successivement sur 25, puis 100 mL de bouillon. Après une préculture durant 12 h, les bactéries sont diluées dans 500 mL de bouillon pour obtenir une densité optique (DO) initiale de 0,1. L'expression est induite en phase exponentielle de croissance (DO comprise entre 0,4 et 0,6) par ajout de 1mM d'IPTG et par culture 4 h à 37°C sous agitation orbitale de 225 rpm. Après centrifugation 5 mn à 10000 rpm des bactéries, les protéines totales sont extraites à l'aide du kit commercial PolyHis Protein Purification System (Invitrogen) selon les recommandations du fabricant.

L'expression est vérifiée par analyse des échantillons en SDS-PAGE et migration de 90 mn sur gel d'acrylamide de 16,5 % à 200V (cf. annexe). Chaque gel est réalisé en double : le 1^{er} étant coloré au bleu de Coomassie pour vérifier la surexpression de la protéine d'intérêt, et le 2^{ème} utilisé pour réaliser un western blot destiné à vérifier la spécificité de la bande surexprimée. Le western blot est réalisé sur membrane de PVDF (Amersham) par hybridation primaire avec l'anticorps monoclonal de souris anti-Xpress (Invitrogen), selon les recommandations du fabricant et révélation par immunofluorescence grâce à un anticorps de chèvre anti-anticorps de souris couplé à la peroxydase (Gibco).

L'analyse des gels et des westerns blot de cette série d'expressions aux conditions standard a révélé que pUL56-ZF n'était pas exprimé par les cellules TOP10F' pour les clones pUL56-ZF- α 1 et pUL56-ZF- α 10. D'autres conditions de culture et d'expression ont été testées avec le même protocole : culture sur milieux riches (BHI puis SOC, compositions en annexe), culture à 25°C durant 12 h, expression pilote avec prise d'aliquotes toutes les heures pour déterminer le temps optimal de production. Cette série de tests a montré que, quelles que soient les conditions, les cellules TOP10F' ne surexprimaient pas pUL56-ZF. Par ailleurs, un témoin positif d'expression (à partir du plasmide pRSETA/ β gal) a été produit et exprimé dans les mêmes conditions que l'expression pilote révélant un haut rendement d'expression et une forte croissance cellulaire tandis qu'une faible croissance est observée pour les clones

pUL56-ZF- α 1 et pUL56-ZF- α 10. Cette observation suggère que la croissance des clones est limitée par une toxicité induite par le peptide recombinant.

Pour pallier ce problème de toxicité, nous avons utilisé les plasmides pUL56-ZF- α 1/pRSETB et pUL56-ZF- α 10/pRSETB extraits à partir des clones pUL56-ZF- α 1 et pUL56-ZF- α 10 pour transformer des cellules BL21(DE₃)pLysS. Cette souche d'*E. coli* possède un plasmide pLysS qui code pour un répresseur fort du promoteur T7 inhibant complètement l'expression des gènes sous son contrôle tant que la répression n'est pas levée par une induction à l'IPTG. Cette stratégie permet de constituer un stock suffisant de cellules avant l'induction, permettant ainsi de limiter les problèmes de toxicité des peptides recombinants à produire.

Dans un premier temps, nous avons réalisé une expression pilote sur les deux clones selon le protocole d'expression précédemment cité. L'analyse des échantillons par SDS-PAGE a révélé que les cellules BL21(DE₃)pLysS exprimaient bien pUL56-ZF pour les deux clones (pUL56-ZF- α 1 et pUL56-ZF- α 10) et nous a permis de déterminer la durée optimale d'expression (4 h).

Dans un deuxième temps, nous avons appliqué ce protocole sur 500 mL de culture avec 4 h d'induction pour l'expression de pUL56-ZF à partir des clones BL21(DE₃)pLysS/pUL56-ZF- α 1 et BL21(DE₃)pLysS/pUL56-ZF- α 10. Différents témoins d'expression ont été réalisés en parallèle sur 50 mL de culture selon les mêmes conditions : un témoin positif d'expression transformé avec le plasmide pRSETA/ β gal, une expression sur cellules non transformées, un témoin sur cellules transformées avec le plasmide pRSETB sans insert. L'analyse des échantillons a été réalisée selon le protocole précédemment cité. Les résultats sont présentés figure 29A.

L'analyse du gel coloré en Coomassie et du western blot révèle que le peptide recombinant pUL56-ZF a bien été produit pour les deux clones, avec un meilleur rendement pour le clone BL21(DE₃)pLysS/pUL56-ZF- α 1. Nous avons donc conservé ce clone pour les manipulations suivantes.

Purification du peptide recombinant pUL56-ZF

Les extraits protéiques issus de l'expression à partir du clone BL21(DE₃)pLysS/pUL56-ZF- α 1 ont été utilisés pour les étapes de purification de pUL56-ZF. Nous avons réalisé différentes séries de purification sur résine à l'aide du kit commercial PolyHis Protein Purification System, Invitrogen, selon les recommandations du fabricant. Les résultats de cette purification sont présentés figure 29B. Aucune des séries réalisées n'a permis d'obtenir un

peptide pur (présence de nombreuses protéines aspécifiques), malgré la tentative d'optimisation des conditions de purification : diminution du temps de fixation, modifications des conditions de lavage (pH, augmentation du nombre et de la durée des lavages), modification des conditions d'éluions (pH, durée, nombre des éluions). Ainsi, le modèle d'expression de pUL56-ZF en plasmide pRSETB nous a-t-il permis d'obtenir de bons rendements d'expression, mais le système de purification sur résine associé à ce modèle, basé sur la chromatographie d'affinité pour les segments polyHis, ne permet pas d'obtenir un bon niveau de purification de pUL56-ZF. La pureté du peptide constitue toutefois un critère majeur pour l'étude ultérieure de pUL56-ZF.

Clonage de la séquence codante de pUL56-ZF dans pFN₂A-GST-pRSETB

Afin d'obtenir un système d'expression et de purification de pUL56-ZF alliant efficacité (en termes de rendement) et fiabilité (en termes de pureté), nous avons décidé de changer de méthode de purification. Nous avons ainsi incorporé à notre peptide recombinant, un tag GST (Glutathion S-transférase) qui permet, en utilisant l'affinité de cette enzyme pour le glutathion, de purifier des peptides recombinants avec une très grande spécificité. Par ailleurs, afin de pouvoir disposer d'un peptide parfaitement pur nous avons jugé intéressant de conserver le tag polyHis entre le tag GST et le peptide. Ainsi, nous sera-t-il possible de réaliser deux purifications successives basées sur l'affinité pour le glutathion, puis, après clivage du tag GST, sur l'affinité pour les segments polyHis. Dans cette optique, nous avons fabriqué un plasmide « maison », pFN₂A-GST-pRSETB, à partir de deux plasmides commerciaux : pFN₂A-GST (promega), qui permet l'insertion du tag GST et d'un site protéasique (pour le clivage du tag), et le plasmide pRSETB précédemment utilisé, qui permet d'insérer un tag polyHis, un site antigénique AntiXpress et le site protéasique entérokinase (figure 28B).

Le plasmide maison pFN₂A-GST-pRSETB a été construit par insertion du site multiple de clonage du plasmide pRSETB dans le plasmide pFN₂A-GST comme présenté figure 30. A cet effet, le site multiple de clonage de pRSETB a été amplifié avec incorporation en 5' et 3' des sites de restriction *sgfI* et *pmeI* respectivement. Après clivage des inserts et du plasmide avec un mélange des deux enzymes (Promega), la ligature a été effectuée à l'aide de la ligase T4 selon les recommandations du fabricant. Ce plasmide sera utilisé pour les productions ultérieures.

En parallèle, nous avons directement inséré dans le plasmide pFN₂A-GST, selon le même protocole, le site multiple de clonage du plasmide pUL56-ZF- α 1/pRSETB contenant la

séquence codante de pUL56-ZF, nous permettant ainsi l'expression d'un peptide pUL56-ZF avec les différents tags. Le produit de ligature a été utilisé pour transformer des cellules TOP10F', afin de sélectionner les clones d'intérêt par PCR de criblage selon le protocole précédemment cité, puis par séquençage des clones positifs.

Les plasmides extraits à partir de deux clones sélectionnés ont été utilisés pour transformer des cellules BL21(DE₃)pLysS selon le même protocole que pour les cellules TOP10F'.

Production in vitro de pUL56-ZF/GST

A l'instar de la production de pUL56-ZF, nous avons, dans un premier temps, réalisé une expression pilote sur les deux clones selon le protocole d'expression précédemment cité. L'expression a été réalisée en parallèle à 25°C durant 12 h. En effet, cette possibilité est proposée par le fabricant pour augmenter le rendement d'expression, notamment en cas de toxicité de la protéine produite. L'analyse des échantillons par SDS-PAGE a révélé que les cellules BL21(DE₃)pLysS exprimaient bien pUL56-ZF/GST pour les deux clones (pUL56-ZFGST1 et pUL56-ZF/GST2) et nous a permis de déterminer que la durée optimale d'expression à 37°C était de 4 h mais que l'expression à 25°C semblait avoir un meilleur rendement.

Dans un deuxième temps, nous avons appliqué ce protocole pour exprimer pUL56-ZF/GST sur un grand volume de culture. L'analyse des échantillons, réalisée selon la méthode précédemment citée par SDS-PAGE, et coloration au bleu de Coomassie puis par western blot, révèle que le peptide pUL56-ZFGST est fortement surexprimé à 25°C pour les deux clones (figure 30A).

Purification du peptide recombinant pUL56-ZF/GST

La purification de pUL56-ZF/GST a été effectuée à partir des extraits protéiques totaux des deux clones exprimés à 25°C, sur microbilles magnétiques à l'aide de la trousse commerciale MagneGST protein purification kit (Promega) à partir d'aliquotes de 2 mL, selon les recommandations du fabricant. Afin d'optimiser la technique de purification, le délai de contact de l'extrait avec les billes magnétiques et le nombre de lavages et d'élutions ont été optimisés. Les conditions optimales retenues sont 1 h de fixation suivie de 5 lavages de 2 mn, 2 éluions de 15 mn dans 1 mL de tampon d'éluion puis une éluion finale de 30 mn. Les extraits et éluats sont analysés par SDS-PAGE afin de vérifier l'efficacité de la purification. Ces analyses montrent que cette méthode de purification permet d'obtenir un bon rendement et une bonne efficacité quant à la pureté du peptide, comme présenté figure 30B.

Cette technique permet de traiter les extraits de protéines totales uniquement par aliquotes de 2 mL, aussi, plusieurs séries ont-elles été nécessaires pour obtenir un stock de pUL56-ZF/GST suffisant (40 mL environ) pour réaliser les tests préliminaires destinés à en vérifier la qualité. Les premiers dosages réalisés sur un pool de 8 purifications (soit 16mL : 8 fois 2 éluions de 1mL) ont révélé que le protocole de production et de purification établi permettait d'obtenir près de 9 mg de pUL56-ZF/GST, ce qui correspond à 3mg de pUL56-ZF, soit un rendement de 0,2 mg/mL d'extrait de pUL56-ZF après purification.

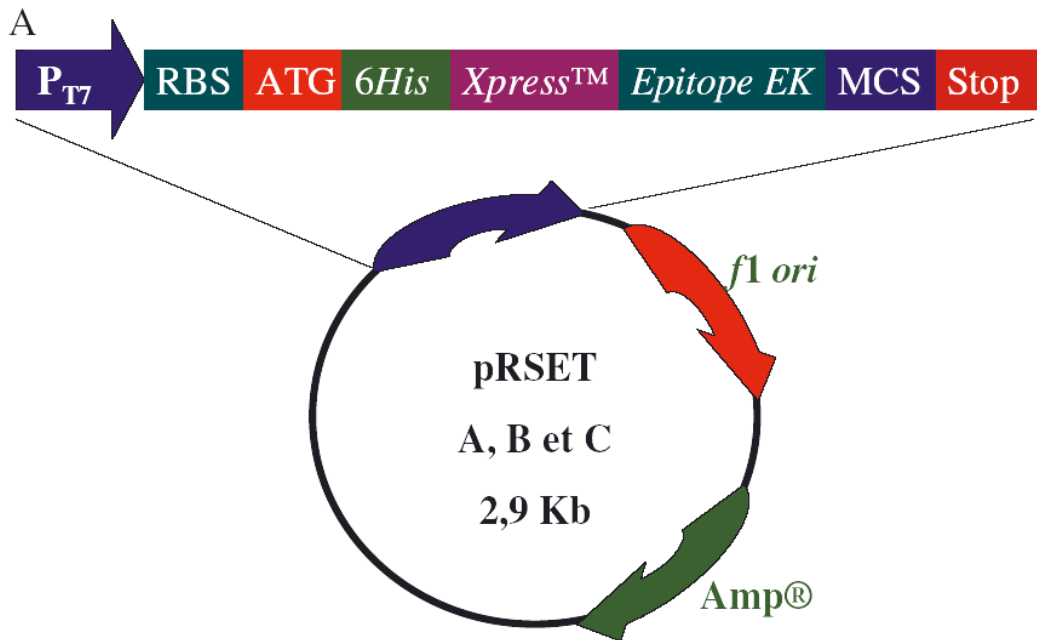
Analyse structurale du peptide pUL56-ZF recombinant :

Après clivage par l'entérokinase, le peptide pUL56-ZF/GST ainsi produit est en cours d'analyse selon la même procédure que le peptide synthétique afin de comparer les résultats. Cette analyse nous permettra de déterminer si le protocole de production et de purification établi permet d'obtenir le peptide dans les bonnes conditions de structuration pour réaliser les tests structuraux et fonctionnels ultérieurs.

Par ailleurs, la construction d'un modèle théorique de la structure tridimensionnelle du doigt de zinc (figure 31) suggère que des acides aminés localisés en amont du résidu 183 pourraient être impliqués dans la constitution d'un feuillet- β qui permettrait la stabilisation du doigt de zinc. Ainsi, les résidus localisés dans le segment 152-183 pourraient-ils être impliqués dans la structuration du doigt de zinc. Même si ce modèle reste théorique, l'absence de ces résidus dans le peptide synthétique pUL56-ZF pourrait en partie expliquer le manque de stabilité du doigt de zinc dans certaines conditions, et en particulier, les problèmes de structurations identifiés en spectroscopie de dichroïsme circulaire, se traduisant par un changement de mode de coordination.

Aussi, apparaît-il intéressant de produire différents peptides afin de vérifier cette hypothèse et d'identifier les résidus nécessaires à la structuration du doigt de zinc et donc à la fonction de pUL56. A cet effet, deux autres peptides correspondant aux fragments de pUL56 localisés entre les résidus 152 à 233, notés pUL56-ZF-152/233, et entre les résidus 175 à 233, noté pUL56-ZF-175/233, sont en cours de production selon le protocole développé ultérieurement pour le peptide pUL56-ZF/GST. Enfin, après construction par PCR assemblage, des séquences codantes pour les plasmides équivalents, portant la mutation Q204R, les peptides pUL56-ZF-152/233-mut et pUL56-ZF-175/233-mut sont en cours de production selon la même procédure. **L'analyse structurale de ces peptides permettra de**

mesurer l'impact de la mutation Q204R sur la structuration du doigt de zinc, et à terme d'évaluer l'effet de la mutation sur la fixation du BDCRB et du TCRB.

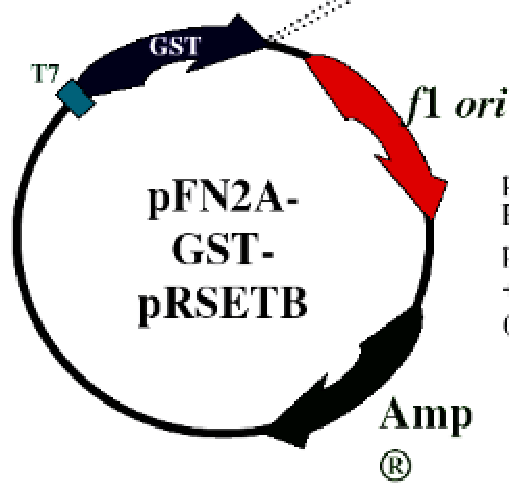
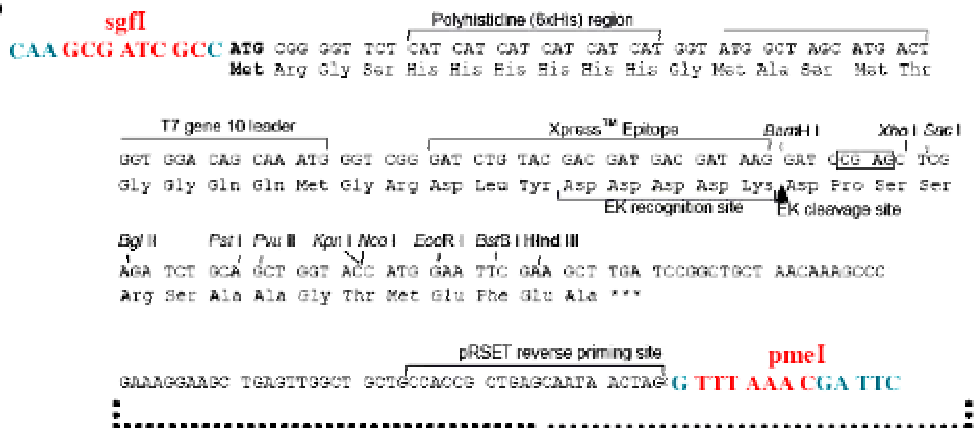


6His : Polyhistidine : Extraction/purification

Xpress™ : Site antigénique : Western blot

Epitope EK : Site de clivage par l'Enterokinase K : retrait des tags après purification

B



pFN2A-GST-pRSETB :
Plasmide "maison" composé de
pFN2A-GST (Promega)
+ site de clonage de pRSET B
(Invitrogen)

Figure 28 : Site multiple de clonage du plasmide pRSETB et Carte du plasmide maison pFN2A-GST-pRSETB

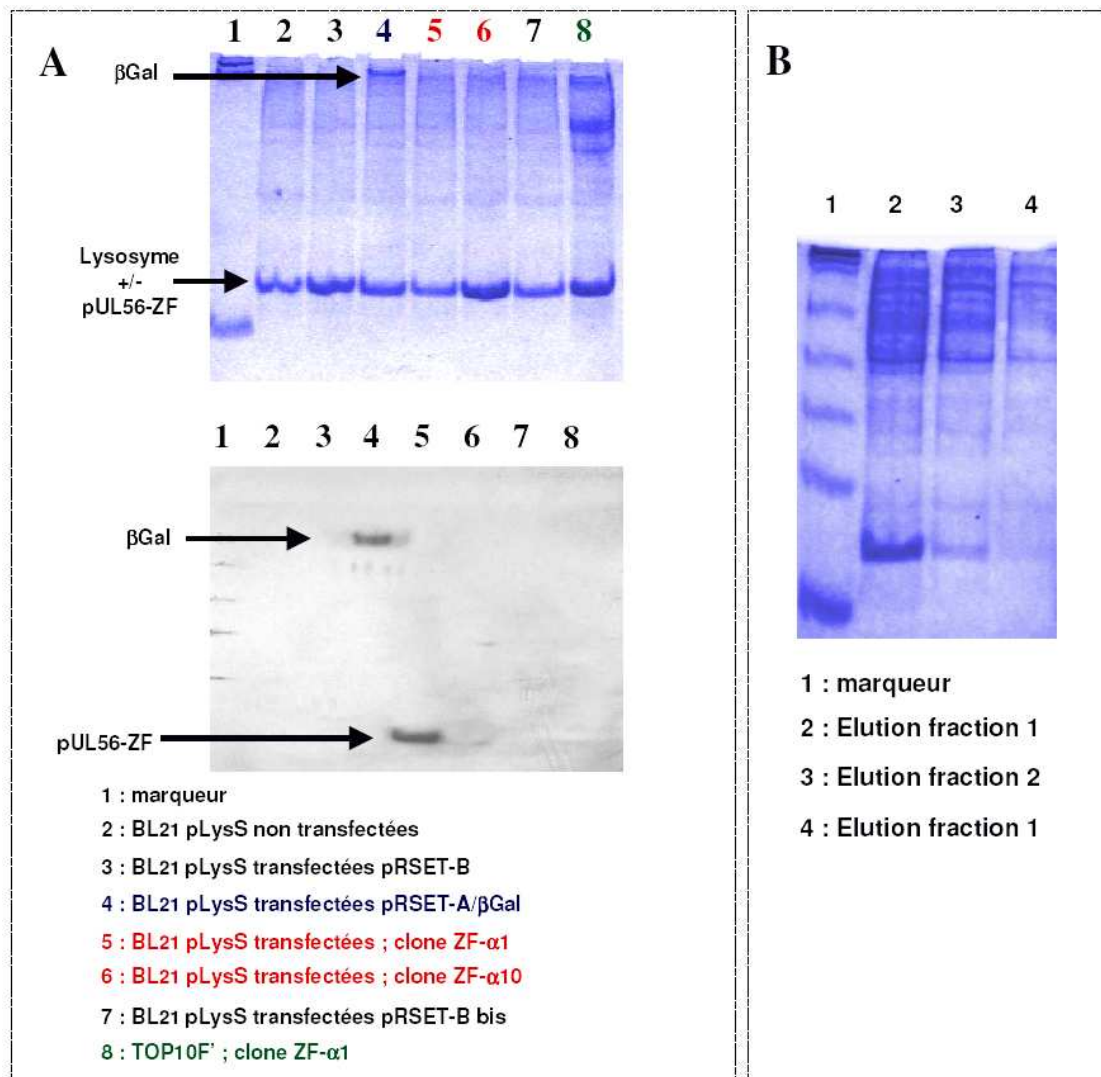


Figure 29 : Production et purification de pUL56-ZF sur résine (PolyHis protein purification system, Invitrogen)

A : Résultat de l'analyse en SDS-PAGE de l'expression de pUL56-ZF sur cellules BL21(DE₃)pLysS avec les différents témoins d'expression. pUL56-LZ a le même poids moléculaire que le lysosime (15KDa) utilisé lors de l'étape de lyse cellulaire, rendant difficile l'observation directe de la surexpression sur Coomassie (en haut). L'expression est toutefois révélée par le western blot (en bas) puisque l'anticorps permet de détecter le témoin d'expression pRSETA/βgal (piste 4) et le peptide recombinant pour les clones BL21(DE₃)pLysS/pUL56-ZF-α1 (piste 5) et BL21(DE₃)pLysS/pUL56-ZF-α10 (bande très faible piste 6) L'échantillon correspondant à l'expression de pUL56-ZF sur cellules TOP10F' a été déposé en parallèle (piste 8).

B : Résultat de l'analyse en SDS-PAGE de la purification du peptide recombinant pUL56-ZF sur résine (polyHis Protein Purification System). Le peptide d'intérêt se retrouve majoritairement dans la 1^{ère} fraction d'élution, et à concentration moindre dans les deux fractions suivantes. Cependant, de nombreuses bandes aspécifiques sont observables, révélant que la purification de pUL56-ZF n'a pas permis d'obtenir un peptide pur.

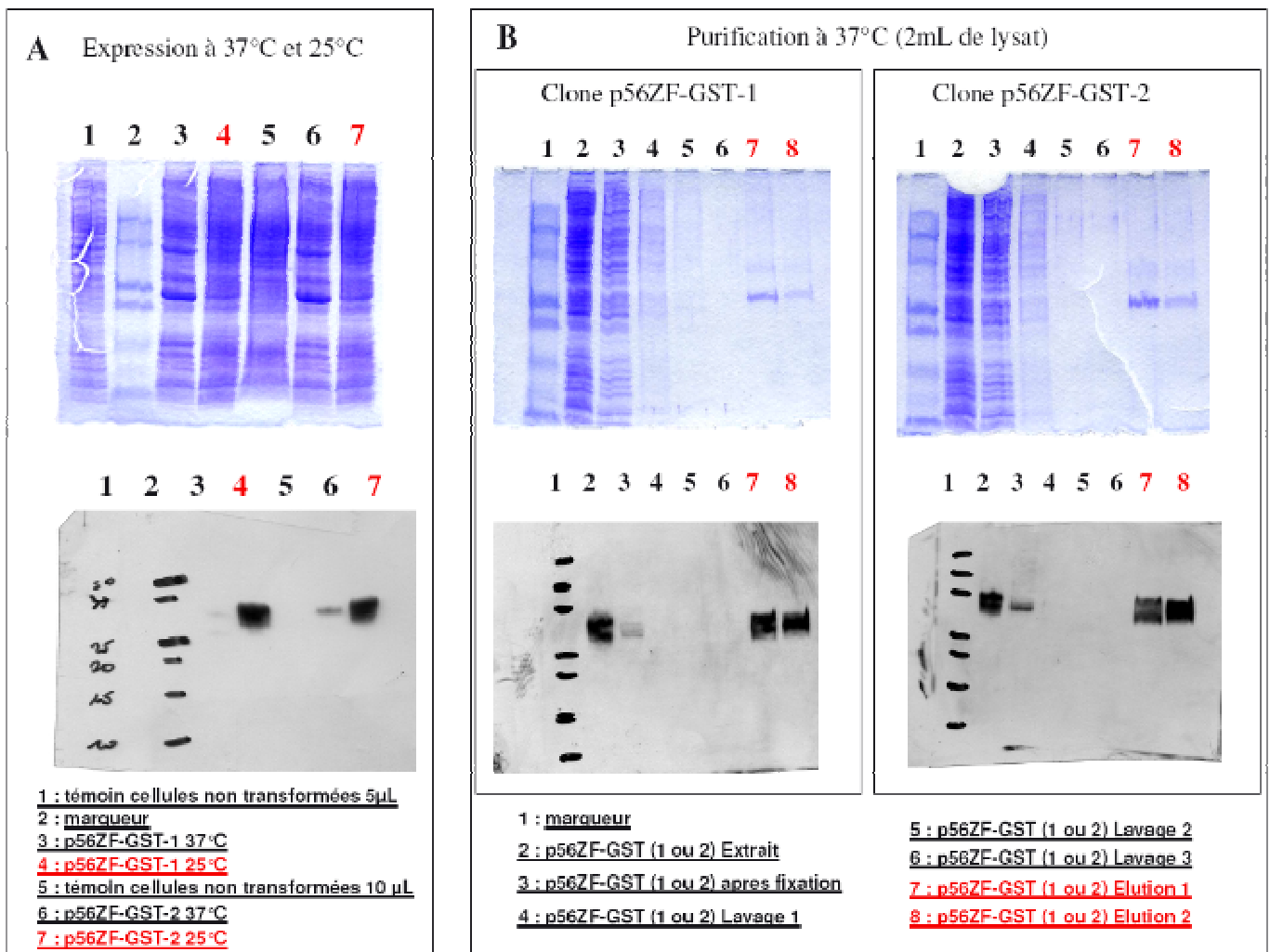


Figure 30 : Production et purification de pUL56-ZF/GST sur billes magnétiques (MagneGST protein purification system, Promega)

A : Résultat de l'analyse en SDS-PAGE de l'expression de pUL56-ZF sur cellules BL21(DE₃)pLysS à partir des clones pUL56-ZF/GST1 et pUL56-ZF/GST2, après induction 4 h à 37°C ou overnight à 25°C. Alors que la coloration au bleu de Coomassie montre la présence de bandes surexprimées pour les échantillons résultant de l'expression à 37°C, le western blot révèle que l'expression à 25°C a un rendement bien supérieur. Cette condition a donc été retenue pour les purifications ultérieures.

B : Résultat de l'analyse en SDS-PAGE des tests de purification de pUL56-ZF-GST sur microbilles magnétiques à l'aide du kit MagneGST Protein Purification System, Promega. Cette analyse révèle que la méthode utilisée a un bon rendement pour les deux clones et permet d'obtenir un peptide relativement pur. A noter la présence d'une double bande détectée par Coomassie (à 25 KDa et à 35 KDa environ) et par western blot pouvant résulter de conformations différentes du peptide ou de la présence de GST seule (à 25KDa). Les purifications ultérieures au clivage des tags devraient permettre d'éliminer cette double bande.

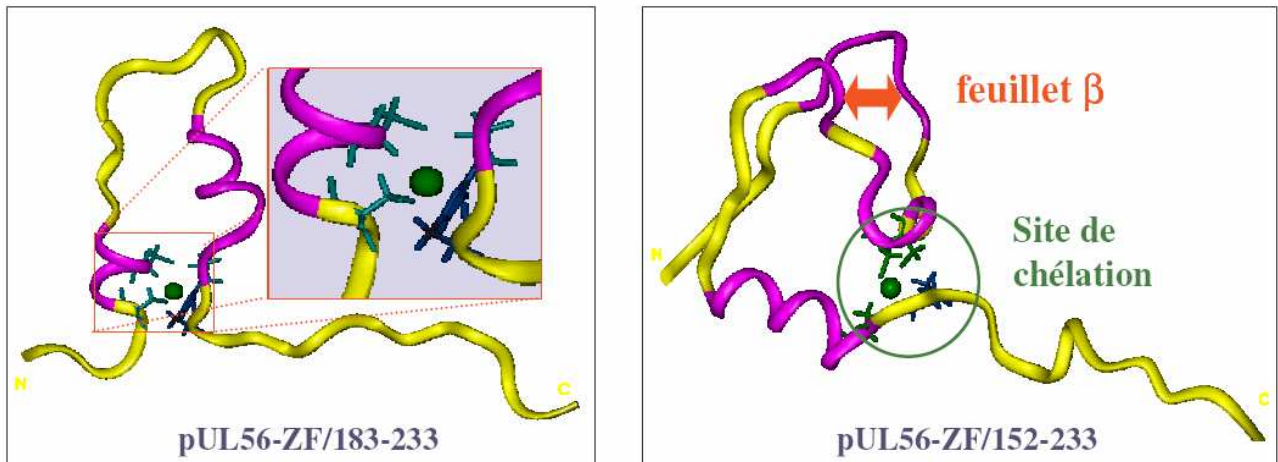


Figure 31 : Structure tridimensionnelle théorique de pUL56-ZF/183 et pUL56-ZF/152

Construction de la structure tridimensionnelle théorique des segments peptidiques de la protéine d'encapsulation pUL56 compris entre les résidus 183 à 233 (pUL56-ZF ou pUL56-ZF183/233) et 152 à 233 (pUL56-ZF/152-233). Ces modèles suggèrent que la structure du doigt de zinc et du site de chélation tétraédrique du zinc pourrait être stabilisée par un feuillet- β impliquant des acides aminés localisés en amont du résidu 183 et formant une boucle qui permettrait l'interaction avec les résidus localisés dans la boucle du doigt de zinc.

2- Analyse du polymorphisme naturel et de la structure primaire de la protéine d'encapsidation pUL89 ; Construction d'un modèle théorique du site catalytique ATPasique (Article-9)

Introduction

A l'instar de pUL56, la protéine pUL89, grande sous-unité du complexe terminase, intervient dans l'encapsidation de l'ADN virale. Peu de données sont disponibles quant à sa fonction réelle, mais sa conservation chez les herpèsvirus a permis d'émettre l'hypothèse que pUL89 interviendrait dans le clivage et la translocation ATP-dépendante de l'ADN viral en collaboration avec pUL56. Des travaux réalisés sur la grande sous-unité du complexe terminase gp17 du bactériophage T4 et chez quelques terminases virales ont montré l'existence d'un ensemble de domaines conservés constituant ce que les anglo-saxons nomment "ATPase motor" : site catalytique de l'activité ATPasique (Mitchell, Matsuzaki *et al.* 2002). Mitchell et coll. ont ainsi identifié quatre domaines de cet ATPase motor au sein de pUL89. Malgré la présence de ces domaines, une étude de Bogner montre que pUL89 seule ne porte pas, *in vitro*, d'activité ATPasique (Bogner 2002) confirmant ainsi les observations de Mitchell et coll. quant à la nécessité d'un autre partenaire protéique pour l'acquisition de cette activité.

L'objectif de notre étude était d'identifier les domaines fonctionnels et les régions variables de la protéine, à partir de l'étude de son polymorphisme naturel, par séquençage de la totalité du gène, puis d'identifier les régions conservées de la protéine par alignement de sa séquence en acides aminés avec celle d'homologues chez les herpèsvirus humains et animaux et par analyse de sa structure primaire.

Nous avons donc développé le séquençage du gène *UL89* sur le modèle des génotypes de *UL56*, *UL97* et *UL54*. Nous avons étudié la conservation intra-espèces (pour l'identification du polymorphisme naturel) par séquençage du gène *UL89* chez quatre souches de référence, et 25 isolats cliniques issus de patients naïfs de tout traitement et par comparaison à la séquence de la souche de référence AD169. Enfin, la troisième étape de notre travail était d'étudier la conservation inter-espèces de la protéine pUL89, par alignement de sa séquence en acides aminés avec celle d'homologues chez 17 herpèsvirus humains et animaux pour identifier les domaines fonctionnels importants.

Matériels et méthodes : Développés dans l'article complet ci-après

Résultats et discussion

L'étude du polymorphisme naturel de pUL89 a révélé que pUL89 était très conservée avec des taux de conservation intra et inter-espèce de 99 % et 35 % respectivement. Nous avons décrit 26 polymorphismes au sein de pUL89, qui sont détaillés dans le tableau 8.

Par alignement de la séquence de pUL89 avec celle de 17 homologues chez des herpèsvirus humain et animaux, nous avons décrit 12 régions conservées, que nous avons nommées régions conservées I à XI.

L'analyse de la séquence de ces régions nous a permis d'identifier des domaines fonctionnels potentiellement impliqués dans les activités ATPasique et endonucéasique et dans l'interaction avec la capsid et l'ADN.

Concernant l'activité ATPasique, nous avons ainsi montré que les régions conservées I, II, III et V contiennent les domaines de l'"ATPase motor" décrits par Mitchell et coll. : *Adenine Binding site* (région conservée I), Boîte de Walker A (région conservée III), Boîte de Walker B (région conservée V), et *ATPase coupling site* (région conservée V). Par ailleurs, nous avons décrit, au sein des motifs d'acides aminés composant ces domaines, différents résidus potentiellement importants pour l'activité ATPasique : Lysine K218, Arginines R214 et R215 (Arginine finger γ -phosphate sensor), Aspartate D309 (*catalytic carboxylate aspartate*), S337, S338 et T339 (*ATPase coupling helicase site*).

S'agissant de l'activité endonucléasique, nous avons identifié deux domaines fonctionnels potentiels, localisés dans les régions conservées VIII et IX. Au sein de ces domaines, nous avons identifié deux résidus parfaitement conservés chez les herpèsvirus qui sont les homologues de résidus critiques pour l'activité nucléasique : aspartate D463 dans la région conservée VIII et histidine H494 dans la région conservée IX.

Concernant l'interaction avec la capsid, nous avons identifié deux domaines probablement impliqués dans l'interaction de pUL89 avec la protéine portail de la capsid pUL104. Ces domaines sont localisés dans les régions conservées VI et XII.

Enfin nous avons décrit l'existence d'un domaine dont la séquence pourrait permettre la constitution d'un doigt de zinc de type CHCC. Les acides aminés impliqués dans ce potentiel doigt de zinc (C367, H370, C383 et C385) sont parfaitement conservés chez les herpèsvirus.

Ce doigt de zinc pourrait être impliqué dans l'interaction de pUL89 avec l'ADN comme le suggère sa proximité avec les domaines de l'ATPase motor et avec les domaines nucléasiques.

Cette analyse de la conservation intra- et inter-espèces de pUL89 nous a permis d'identifier différents domaines fonctionnels de la protéine probablement impliqués dans les activités ATPasique et endonuléasique et dans l'interaction avec l'ADN et avec la protéine portail de la capsid. Enfin, à l'instar de pUL54 et de pUL97, nous avons construit un modèle théorique du site catalytique ATPasique de pUL89 qui pourra être utilisé à terme pour analyser l'effet de nouvelles mutations sur la fonction de la protéine.

Polymorphisme	Présent sur les souches de Référence	Polymorphisme	Présent sur les souches de Référence
T37A	Toledo/Davis/Towne	N294D	—
L89P	—	S345A	Toledo/Davis/Towne
D94N	Davis	T448I	—
K95E	Toledo/Davis/Towne	C511F	—
H216R	—	I531V	—
G239C	—	L548V	—
Q244H	—	L548A	—
Q249H	—	L633V	—
K253Q	—	G635S	—
K253T	—	D665E	Towne
E254A	—	A668P	—
R258P	—	F671S	—
A283P	—	R672K	

Tableau 8 : Polymorphisme naturel de la protéine pUL89

La séquence de référence est celle de la souche AD169, PDB N° CAA35363.

➡ **Article-9**

New functional domains of human cytomegalovirus packaging protein pUL89 identified by sequence analysis, and three-dimensional modeling of the catalytic site DEXDc. G. Champier, S. Hantz, A. Couvreur, S. Stuppfler, M. C. Mazon, F. Denis, and S. Alain. Soumis à *Antiviral Therapy*. Mai 2006.

3- Analyse du polymorphisme naturel et de la conservation inter-espèces de la protéine portail pUL104

Introduction

La protéine portail du cytomégalo virus pUL104 se complexe sous forme d'oligomères au niveau de la capsidie permettant la constitution de canaux. C'est par l'intermédiaire de ces canaux qu'est réalisée la translocation ATP-dépendante de l'ADN par les protéines d'encapsidation pUL56 et pUL89 (Newcomb, Juhas *et al.* 2001; Newcomb, Homa *et al.* 2005). Les dérivés benzimidazolés D-ribonucléosidiques, BDCRB et TCRB, inhibent spécifiquement l'étape d'encapsidation de l'ADN viral, en ciblant les protéines pUL56 et pUL89 (Krosky, Underwood *et al.* 1998). Une étude plus récente a toutefois révélé que pUL104 jouait aussi un rôle dans le mécanisme d'action des dérivés benzimidazolés : il a en effet été démontré que la mutation L21F de pUL104 était associée à une compensation de l'effet des mutations de résistance de pUL56 et pUL89 aux dérivés benzimidazolés dextrogyres (Komazin, Townsend *et al.* 2004).

L'existence d'une mutation compensatoire suggère une interaction directe ou indirecte entre pUL104 et les terminases. De ce fait, l'étude des mutations de pUL104 en réponse à l'administration de dérivés benzimidazolés est complémentaire de celle des terminases. Aussi, avons-nous développé une méthode de génotypage du gène *UL104*, sur le modèle des autres cibles antivirales, qui pourra être utilisée dans le cadre de la surveillance de la résistance à cette molécule.

Dans un deuxième temps, nous avons utilisé la méthode de génotypage développée pour analyser le polymorphisme naturel de la protéine pUL104 afin de faciliter la détection des mutations potentiellement associées à des résistances ou à des effets de compensation. Enfin, afin d'identifier les régions conservées dont la connaissance pourrait être utile dans le cadre de l'étude de nouvelles mutations, nous avons analysé la conservation inter-espèces de la protéine.

Matériels et méthodes

Amplification du gène UL104 :

Après extraction de l'ADN viral à partir de cellules infectées selon la méthode de Hirt (Hirt 1967), l'amplification est réalisée par PCR nichée. Différentes conditions d'amplification ont été testées afin d'optimiser la méthode d'amplification en termes de spécificité et de sensibilité : concentration en DMSO, concentration en MgCl₂ et cycle d'amplification. Le protocole retenu est cité ci-dessous.

La PCR externe fait appel à deux amorces englobant largement le gène *UL104*, UL104-Ext1 et UL104-Ext2, permettant la constitution d'un fragment de 2841 pb. La PCR interne est basée sur deux amorces, UL104-Int1 et UL104-Int2, encadrant plus étroitement *UL104* et permettant l'amplification d'un segment de 2658 pb. Ces amorces ont été sélectionnées grâce au logiciel Genwork® et sont synthétisées par Proligo. Leur séquence est présentée dans le Tableau 9.

Oligonucléotide		Séquence	taille
Amplification			
UL104-Ext1	sens	5' -GCGATCACCGTGGTACCG-3'	2841 pb
UL104-Ext2	antisens	5' -TGGAAGAGCACGAAGGTAGC-3'	
UL104-Int1	sens	5' -ACCGGTGATCACGCAATCT-3'	2658 pb
UL104-Int2	antisens	5' -ACTTGCGCGTTTAAAGTTGCA-3'	
Séquençage			
UL104-1	sens	5' -GAGTGAACGGTCGTCGTTG-3'	/
UL104-2	antisens	5' -TTCTTGAAGACGCGTACCTCG-3'	/
UL104-3	sens	5' -CACCGAGACACACCCGCT-3'	/
UL104-4	antisens	5' -ACCAGGCGGTTGTCTTCCA-3'	/
UL104-5	sens	5' -CGAACTGCGCGACCTCGTCA-3'	/
UL104-7	antisens	5' -ACACGGCGGAGTAGCCTAGA-3'	/

Tableau 9 : Amorces utilisées pour le séquençage et l'amplification de pUL104

Les réactions d'amplification des deux PCR sont réalisées, sur 1 µL d'extrait d'ADN, dans un volume final de 50 µL en présence de polymérase *Taq* High Fidelity™, Roche Boehringer, 200 µM de dXTP, Roche Boehringer, 5 % de DMSO, 25 pmoles de chaque amorce, et 1.25 mM de MgCl₂ et 10 % de tampon 10X.

Les cycles d'amplification sont les mêmes pour les deux PCR: dénaturation de l'ADN matrice 3 mn à 94°C, puis 10 cycles de dénaturation 15 s à 94°C, 15 s d'hybridation à 57°C et 2 mn d'élongation à 68°C, suivent 20 cycles similaires avec une incrémentation de 5 s par cycle pour l'étape d'élongation. L'amplification se termine par une étape d'élongation finale de 10 mn à 70°C. Les réactions sont effectuées dans thermocycleurs Cetus 2700 ou 2400 (Applied Biosystems).

L'efficacité de la réaction d'amplification est contrôlée par électrophorèse 25 min à 100 V, en gel d'agarose 1 % (Gibco) coloré au bromure d'éthidium (Eurobio) en tampon TBE 0,5 X. Cinq µL du marqueur de poids moléculaire et de quantification Smart Ladder, (Eurogentec) de titre connu sont déposés en parallèle afin de vérifier la taille du fragment amplifié et d'en évaluer la concentration.

Les produits de PCR sont ensuite conservés à - 20°C.

Séquençage du gène UL104 :

Après purification des produits d'amplification sur minicolonnes à l'aide des trousse PCR purification Kit, Qiagen ou PCR CleanUp PCR Purification System, Promega, le gène *UL104* est séquencé à l'aide de 6 amorces décrites dans le tableau 8 et sélectionnées selon les mêmes critères que les amorces d'amplification.

La réaction d'amplification est réalisée sur un volume final de 10,5 µL contenant 3µL de produit d'amplification purifié (100 à 200 ng d'ADN), 2,5 µL d'amorce (25 pMoles), 2,5 µL de tampon 5X (ABI Prism BigDye® Terminator v3.1, v1.1 sequencing buffer) et 2,5 µL de mélange réactionnel ABI Prism BigDye® Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit. L'amplification est réalisée par 25 cycles contenant une étape de dénaturation de 10 s à 96°C, une hybridation de 5 s à 50°C et une élongation de 2 mn à 60°C, puis l'amplification est achevée par une élongation finale de 10 mn à 60°C.

Les produits de séquençage sont purifiés par précipitation dans une solution d'éthanol absolu, AcNa 60 mM et EDTA 2,5 mM puis analysés par électrophorèse en capillaire sur un séquenceur ABI Prism Sequence analyser 3100, Applied Biosystems.

Les séquences sont corrigées à l'aide du programme Chromas 1.45 (McCarthy School of Health Science Griffith University, Australie), puis analysées à l'aide du logiciel GenObject 3.2, Bayer Diagnosis, par comparaison à la séquence de la souche de référence AD169.

Analyse du polymorphisme naturel de pUL104 :

Nous avons utilisé la méthode de génotypage pour étudier la séquence de pUL104 des 4 souches de référence AD169, Toledo, Towne et Davis, et de 25 isolats cliniques provenant de patients naïfs de tout traitement.

Identification des régions conservées de pUL104 :

Les régions conservées de pUL104 ont été identifiées par alignement de la séquence protéique de pUL104 de la souche AD169 et de 13 homologues chez les herpèsvirus humains et animaux (tableau 10) à l'aide du programme ClustalW du portail Internet IBCP: NPSA: Network Protein Sequence Alignment du Pôle bioinformatique lyonnais: www.pbil.ibcp.fr (Thompson, Higgins *et al.* 1994) et contrôlées à l'aide du logiciel BioEdit version 7.0.0 (Isis Pharmaceuticals, Inc.).

Lig	Identificati on	Séquence	N°Genban k
1	HHV_1	Human herpesvirus 1 Minor capsid protein (697 résidus)	NP_044607
2	HHV_2	Human herpesvirus 2 Minor capsid protein (613 résidus)	NP_044475
3	HHV_3	Human herpesvirus 3 Portal protein (613 résidus)	NP_040176
4	HHV_8	Human herpesvirus 8 ORF 43, minor capsid protein homolog (613 résidus)	AAB62639
5	HHV_4	Human herpesvirus 4 Unnamed protein product (613 résidus)	CAA24820
6	EqHV_2	Equid herpesvirus 2 Minor capsid protein (598 résidus)	NP_042640
7	BHV4	Bovine herpesvirus 4 Capsid protein (616 résidus)	AAF07962
8	PoHV_4	Pongine herpesvirus 4 DNA packaging protein UL104 (671 résidus)	AAM00741
9	MuridHV_2	Murid herpesvirus 2 pR104 (671 résidus)	NP_064204
10	HCMV- AD169	Human herpesvirus 5 HCMVUL104(697 résidus)	CAA35341
11	MuHV_1	Murid herpesvirus 1 Structural protein (704 résidus)	YP_214104
12	HHV_6B	Human herpesvirus 6B U76 (662 résidus)	AAB06359
13	HHV_6	Human herpesvirus 6 H76 (662 résidus)	AAC 40326
14	HHV_7	Human herpesvirus 7 Minor capsid protein (640 résidus)	YP_073816

Tableau 10 : Séquences utilisées pour l'alignement de pUL104 et des homologues chez les herpes virus

Résultat et discussion

Polymorphisme Naturel de pUL104 :

L'étude du polymorphisme naturel de pUL104 a révélé que la protéine était bien conservée avec des taux de conservation intra et inter-espèces de 96,5 % et 23 % respectivement. Nous avons identifié 26 polymorphismes au sein de pUL104, (tableau 11) dont 4 sont présents sur les souches de référence.

Identification des domaines conservés de pUL104 :

Nous avons identifié 7 régions conservées chez les herpesvirus humains et animaux, notées régions conservées I à VII à partir de l'alignement de pUL104 et de 13 homologues chez les herpesvirus humaines et animaux (figure 32).

Région conservée I: cette région localisée entre les résidus I58 et G73 contient 2 résidus parfaitement conservés chez les herpesvirus : la glycine G73, et la proline P60. La proline est localisée dans un domaine d'acides aminés conservés (en termes de propriétés physicochimiques), de motif $_{58}O\emptyset P-S/T_{61}$ ou O est un résidu neutre apolaire, et \emptyset un résidu à chaîne latérale cyclique.

Région conservée II: cette région localisée entre les résidus G80 et L97 contient 5 résidus parfaitement conservés chez les herpesvirus : L87, R88, V92, L97 et la glycine G80. Ce dernier est localisé dans un domaine d'acides aminés conservés, de motif $_{80}G-Q/K-S/T-O\emptyset X_2LR_{88}$.

Région conservée III: cette région localisée entre les résidus Y171 et P185 contient 6 résidus parfaitement conservés chez les herpesvirus inclus dans le motif $_{171}YX_2YO DWX_4GOOP_{185}$.

Région conservée IV: cette région localisée entre les résidus H304 et V319 est très conservée chez les herpesvirus humains et animaux. Elle contient 10 résidus parfaitement conservés inclus dans le motif : $_{304}HXKOCQLLNTXPOKXO_{319}$.

Région conservée V: cette région, localisée entre les résidus K329 et F387, contient 12 résidus parfaitement conservés chez les herpesvirus. K329, E336 et L352 sont disséminés dans la région ; les 9 autres résidus sont inclus dans deux motifs hautement conservés chez les herpesvirus humains et animaux : 2 dans le motif $_{343}DOKX_2OO_{349}$ et 7 dans le motif $_{357}D/E-N/S-K-T/S-X_2GOXDOOEXFOX-D/E-X-S/T-X-N/S-OO-DX_2-R/K-LO_{387}$.

Région conservée VI: cette région localisée entre les résidus V435 et R454 contient 5 résidus parfaitement conservés chez les herpèsvirus : I450 et L453 et les 3 autres résidus sont inclus dans le motif hautement conservé $_{435}\text{OO-R/K-COX}_2\text{QL}_{445}$.

Région conservée VII: cette grande région, localisée entre les résidus V514 et R625, contient 17 résidus parfaitement conservés chez les herpèsvirus. Trois d'entre eux sont localisés dans l'extrémité C-terminale de cette région (E604, Y610 et Y618). Les 14 autres sont inclus dans 4 motifs hautement conservés chez les herpèsvirus humains et animaux : $_{520}\text{OXN SFOSQ}\text{ØOP}_{530}$, $_{542}\text{LWEXEX}_4\text{Ø-R/KO}_{553}$, $_{557}\text{OX-N/H-QG}_{561}$, $_{568}\text{Y-S/T-X}_2\text{-S/T-OX}_2\text{OX}_2\text{P Ø}_{580}$.

Par ailleurs, nous avons identifié, dans la région C-terminale de la protéine, un segment riche en résidus basiques dont la séquence pourrait correspondre à un signal de localisation nucléaire, motif $_{625}\text{RXKXRRRX}_3\text{R}_{635}$, dont la présence pourrait permettre sa localisation intranucléaire au même titre que les autres protéines impliquées dans l'encapsidation de l'ADN viral.

Enfin, nous avons identifié, dans la région centrale de la protéine, une région riche en résidus hydrophobes : $_{390}\text{GPGGPGVVGPGGAVVGGPAGHVGLLPPPPGPAAP}_{423}$ qui pourrait être impliquée dans la flexibilité de la protéine et donc dans sa structuration.

L'étude du polymorphisme a été réalisée sur des isolats indépendants mais provenant du même laboratoire n'est ainsi probablement pas exhaustive, et devrait être étendue à d'autres régions françaises et européennes.

Cette analyse de la conservation intra et inter-espèces de pUL104 a permis de décrire de 7 régions conservées portant des motifs d'acides aminés fortement conservés chez les herpèsvirus humains et animaux. Même si nous n'avons pas pu identifier la fonction de ces différentes régions, leur identification, associée à la connaissance du polymorphisme naturel de la protéine, permettra à terme de **faciliter l'identification de nouvelles mutations, potentiellement impliquées dans les résistances au BDCRB et au TCRB (associées à une résistance ou à une compensation d'autres mutations, à l'image de la substitution L21F).**

Polymorphisme	Présent sur les souches de Référence
T25P	–
G45D	Davis
A197S	–
A238L	Toledo
E258D	–
A272T	Towne
E273K	–
K345E	–
P394T	–
V464L	–
R477H	–
S500G	–
A506G	–

Polymorphisme	Présent sur les souches de Référence
P508L	–
R510L	Davis
P511S	–
A513G	–
D516E	–
R518P	–
F528L	–
F528V	–
I539F	–
E544A	–
A617T	–
G640V	–
E669Q	–

Tableau 11 : Polymorphisme naturel de la protéine portail pUL104

La séquence de référence est celle de la souche AD169, PDB N° CAA35341.

4- Analyse du polymorphisme naturel et de la conservation inter-espèces de la protéine pUL27

Introduction

L'analyse de souches de laboratoire résistantes au maribavir a permis de décrire des mutations associées à la résistance au sein du gène *UL27*. Ce gène de 1827 pb code pour un polypeptide de 608 acides aminés (pUL27) et s'exprime durant la phase précoce du cycle viral (Chambers, Angulo *et al.* 1999). Plusieurs mutations de résistance ont été décrites : R233S (IS50 \approx 5), L335P (IS90 \approx 6), W362R (IS50 \approx 2), A406V (IS50 \approx 4) et la délétion de la partie C-terminale de la protéine à partir du résidu 415 (IS50 \approx 4). L'existence de ces mutations de résistance suggère l'implication de la protéine dans le mécanisme d'action de cette classe de molécules. Toutes ces mutations induisent cependant de faibles niveaux de résistance au MBV comparés à la mutation de résistance identifiée sur pUL97 : L397R, (IS90 \approx 20). Il a ainsi été suggéré que pUL27 était indirectement impliquée dans l'exportation extranucléaire des capsides néoformées par un processus encore inconnu. L'étude de Chou et coll. a aussi permis la description de 25 sites de polymorphisme naturel au sein de pUL27.

Le maribavir est un agent antiviral qui est actuellement en phase II d'essai clinique. L'analyse des souches de laboratoire a rapidement révélé l'émergence de résistances aussi, avons-nous développé une méthode de génotypage du gène *UL27*, adaptable aux échantillons cliniques, sur le modèle des autres cibles antivirales. Cette technique pourra être utilisée, en parallèle du génotypage de *UL97*, dès la mise sur le marché du maribavir, dans le cadre de la surveillance de la résistance à cette molécule.

Dans un deuxième temps, nous avons utilisé la méthode de génotypage développée pour analyser le polymorphisme naturel de la protéine par séquençage complet du gène *UL27* à partir des 4 souches de référence et de 25 isolats cliniques issus de patients naïfs de tout traitement. Cette analyse du polymorphisme a pour objectif de faciliter la détection des mutations potentiellement associées à des résistances. Enfin, afin d'identifier les régions conservées, dont la connaissance pourrait être utile dans le cadre de l'étude de nouvelles mutations, nous avons analysé la conservation inter-espèces de la protéine.

Matériels et méthodes

Amplification de UL27 :

Après extraction de l'ADN viral à partir de cellules infectées selon la méthode de Hirt (Hirt 1967), l'amplification est réalisée par PCR nichée. Différentes conditions d'amplification ont été testées afin d'optimiser la méthode d'amplification en termes de spécificité et de sensibilité : concentration en DMSO, concentration en MgCl₂ et cycle d'amplification. Le protocole retenu est cité ci-dessous.

La PCR externe fait appel à deux amorces, UL27-Ext1 et UL27-Ext2, englobant largement le gène *UL27* et permettant la constitution d'un fragment de 2518 pb. La PCR interne s'appuie sur deux amorces, UL27-Int1 et UL27-Int2, encadrant plus étroitement *UL27* et permettant l'amplification d'un segment de 2155 pb. Ces amorces ont été sélectionnées grâce au logiciel Genwork® et sont synthétisées par Proligo. Leur séquence est présentée dans le Tableau 12.

Oligonucléotide		Séquence	taille
Amplification			
UL27-Ext1	sens	5' -TTCACGTACTGCTGTACGGTACG-3'	2518 pb
UL27-Ext2	antisens	5' -AGTTCTCACCGGCTGATCTCG-3'	
UL27-Int1	sens	5' -CGTGAAGGAGGAGACTGTGA-3'	2155 pb
UL89-Int2	antisens	5' -CCACCAGCAGCTTCCAGTAT-3'	
Séquençage			
UL27-1	sens	5' -GCACGACTGATCTCTGGCA-3'	/
UL27-2	antisens	5' -AGCTGTCTGGTCCATTCAGC-3'	/
UL27-3	sens	5' -GCAACAAAGAGGAGTGGTCA-3'	/
UL27-4	antisens	5' -TGACCACTCCTCTTTGTCGC-3'	/
UL27-5	sens	5' -CGCCAGTATTACGTCACGACGAGT- 3'	/
UL27-7	antisens	5' -CCACCAGCAGCTTCCAGTAT-3'	/

Tableau 12 : Amorces utilisées pour le séquençage et l'amplification de pUL27

Les réactions d'amplification des deux PCR sont réalisées, sur 1 µL d'extrait d'ADN, dans un volume final de 50 µL en présence de polymérase *Taq* High Fidelity™, Roche Boehringer, 200 µM de dXTP, Roche Boehringer, 5 % de DMSO, 40 pmoles de chaque amorces, et 1.5 mM de MgCl₂ contenu dans le tampon 1X.

Les cycles d'amplification sont les mêmes pour les 2 PCR: dénaturation initiale 3 mn à 94°C, puis 10 cycles de dénaturation 15 s à 94°C, 15 s d'hybridation à 56°C et 2 mn d'élongation à 68°C, suivent 20 cycles similaires avec une incrémentation de 5 s par cycle pour l'étape d'élongation. L'amplification se termine par une étape d'élongation finale de 10 mn à 70°C. Les réactions sont effectuées dans thermocycleurs Cetus 2700 ou 2400 (Applied Biosystems).

L'efficacité de la réaction d'amplification est contrôlée par électrophorèse 25 min à 100 V, en gel d'agarose 1 % (Gibco) coloré au bromure d'éthidium (Eurobio) en tampon TBE 0,5 X. Cinq µL du marqueur de poids moléculaire et de quantification Smart Ladder, (Eurogentec) de titre connu sont déposés en parallèle afin de vérifier la taille du fragment amplifié et d'en évaluer la concentration. Les produits de PCR sont ensuite conservés à -20°C.

Séquençage de UL27 :

Après purification des produits d'amplification sur minicolonnes à l'aide des trousse PCR purification Kit, Qiagen ou PCR CleanUp PCR Purification System, Promega, le gène *UL27* est séquencé à l'aide de 6 amorces décrites dans le tableau 11 et sélectionnées selon les mêmes critères que les amorces d'amplification.

La réaction d'amplification est réalisée sur un volume final de 10,5 µL contenant 3µL de produit d'amplification purifié (100 à 200 ng d'ADN), 2,5 µL d'amorce (25 pMoles), 2,5 µL de tampon 5X (ABI Prism BigDye® Terminator v3.1, v1.1 sequencing buffer) et 2,5 µL de mélange réactionnel ABI Prism BigDye® Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit. L'amplification est réalisée par 25 cycles contenant une étape de dénaturation de 10 sec à 96°C, une hybridation de 5 sec à 50°C et d'une élongation de 2 mn à 60°C, puis l'amplification est achevée par une élongation finale de 10 mn à 60°C.

Les produits de séquençage sont purifiés par précipitation dans une solution d'éthanol absolu, AcNa 60 mM et EDTA 2,5 mM puis analysés par électrophorèse en capillaire sur un séquenceur ABI Prism Sequence analyser 3100, Applied Biosystems.

Les séquences sont corrigées à l'aide du programme Chromas 1.45 (McCarthy School of Health Science Griffith University, Australie), puis analysées à l'aide du logiciel GenObject 3.2, Bayer Diagnosis, par comparaison à la séquence de la souche de référence AD169.

Identification des régions conservées de pUL27 :

Les régions conservées de pUL27 ont été identifiées par alignement de la séquence protéique de pUL27 de la souche AD169 avec celle de 9 homologues (tableau 14) chez les herpèsvirus humains et animaux à l'aide du programme ClustalW du portail Internet IBCP : NPSA: Network Protein Sequence Alignment du Pôle bioinformatique lyonnais: www.pbil.ibcp.fr (Thompson, Higgins *et al.* 1994) et contrôlées à l'aide du logiciel BioEdit version 7.0.0 (Isis Pharmaceuticals, Inc.).

Analyse du polymorphisme naturel de pUL27 :

Nous avons mis à profit la méthode d'amplification et de séquençage développée pour analyser le polymorphisme naturel de la protéine pUL27 par génotypage des 4 souches de référence AD169, Toledo, Towne et Davis, et de 25 isolats cliniques naïfs de tout traitement.

Résultats et discussion

Polymorphisme Naturel de pUL27 :

L'étude du polymorphisme naturel de pUL27 a révélé que la protéine était moins conservée que les autres cibles antivirales avec des taux de conservation intra et inter-espèces de 93 % et 20 % respectivement. Nous avons identifié 27 polymorphismes au sein de pUL27 (décrits dans le tableau 14) dont 17 sont présents sur les souches de référence. Onze sites n'avaient pas été identifiés par l'étude de Chou et coll., en 2004, tandis que 9 sites que nous n'avons pas retrouvés sur notre panel de souches avaient été identifiés (Chou, Marousek *et al.* 2004) portant à 38 le nombre de sites de polymorphisme au sein de pUL27.

L'analyse de la localisation de ces polymorphismes révèle l'existence de deux régions variables : d'une part, une région localisée entre les résidus A83 et H97 qui contient 5 sites de polymorphisme pour 14 résidus et, d'autre part, une région localisée entre les résidus D288 et H313, qui contient 11 sites de polymorphisme pour seulement 25 résidus.

Identification des domaines conservés de pUL27 :

Nous avons identifié 6 régions conservées chez les herpèsvirus humains et animaux, notées régions conservées I à VI (figure 33).

Région conservée I: cette région localisée entre les résidus V103 et A139 contient 8 résidus parfaitement conservés chez les herpèsvirus. Cinq résidus sont disséminés dans la région (L110, A118, D132, W136 et A139) et 3 sont localisés dans un domaine fortement conservé chez les herpèsvirus (I124, G126 et L127). A noter la présence de trois sites de polymorphisme naturel de pUL27 dans cette région, L133, A134 et V135 correspondant à des résidus non conservés chez les herpèsvirus.

Région conservée II: cette région localisée entre les résidus Y205 et L209 contient 2 résidus parfaitement conservés chez les herpèsvirus : R207 et L209.

Région conservée III: cette région localisée entre les résidus F280 et R287 contient 2 résidus cystéine parfaitement conservés chez les herpèsvirus : C281 et C283.

Région conservée IV: cette région localisée entre les résidus L330 et L357 contient 7 résidus parfaitement conservés chez les herpèsvirus. Quatre sont localisés dans un domaine fortement conservé chez les herpèsvirus (³³⁵LPXXXHL₃₄₁) : L335, P336, H340 et L341. Deux sont localisés dans un second domaine fortement conservé chez les herpèsvirus : D356 et L357. Enfin le dernier résidu conservé est la glycine G331.

Cette région conservée contient l'un des sites de mutation associée à une résistance au MBV, qui touche un résidu parfaitement conservé, L335P, et est à proximité d'un autre site de résistance (W362R). Ce constat a conduit Komazin et coll. à suggérer le rôle du domaine ³³⁵LPXXXHL₃₄₁ dans le mécanisme d'action du maribavir.

Région conservée V: cette région est localisée entre les résidus M388 et E411. Elle contient uniquement 2 résidus parfaitement conservés, N393 et E411, et un site de résistance au maribavir (A406V) qui concerne un résidu non conservé. Par ailleurs, cette région est localisée à proximité du site de résistance résultant de l'incorporation d'un codon stop en position 415.

Région conservée VI: cette région est localisée entre les résidus E498 et R509. Elle contient seulement deux acides aminés parfaitement conservés : E498 et H503.

Etrangement, les résidus de ces régions conservées ne correspondent pas aux 12 % de résidus homologues de pUL97 décrits par Montague et coll. (Montague and Hutchinson 2000) ; nous ne sommes toutefois pas en mesure de définir si cette homologie entre les deux protéines est un artefact, ou si elle a une signification biologique.

Analyse de la structure primaire de pUL27 :

L'analyse de la séquence primaire de pUL27 nous a permis d'identifier deux domaines protéiques dont la séquence peut être assimilée à des signaux de localisation nucléaire : la première à l'extrémité N-terminale, correspondant aux motifs $_{560}\mathbf{RXRRK}_{564}\text{-X}_{32}\text{-}_{597}\mathbf{RRXR}_{600}$; la seconde correspondant au motif $_{89}\mathbf{KKKX}_4\mathbf{HXKH}_{99}$. Ces domaines pourraient être impliqués dans la localisation nucléaire de la protéine et, à ce titre, avoir un rôle dans sa fonction.

L'étude de l'extrémité N-terminale de pUL27 nous a aussi permis de décrire une région riche en résidus acides (D ou E). Cette poche acide de 33 résidus (entre E17 et E50) contient près de 50 % de résidus acides (16). Nous n'avons pu déterminer la fonction de cette région qui est pourtant conservée dans les 100 premiers résidus de tous les homologues de pUL27 étudiés.

L'analyse de la région variable située entre les résidus D288 et H313 montre la présence de 11 résidus glycine ou sérine pour seulement 25 résidus. Cette région constitue ainsi une région variable riche en glycines et en sérines, et pourrait à ce titre constituer un domaine de flexibilité de la protéine et intervenir dans sa structuration.

Cette analyse de la conservation intra et inter-espèces de pUL27 a permis la description de deux régions variables et de 6 régions conservées. Ces données, associées à la connaissance du polymorphisme naturel de la protéine, permettront à terme de faciliter l'identification de nouvelles mutations potentiellement associées à des résistances au maribavir. L'analyse de la structure primaire de la protéine a permis l'identification d'un domaine de flexibilité de la protéine, probablement impliqué dans sa structuration. Enfin, nous avons identifié des signaux de localisation nucléaire, dont la présence suggère que l'une des fonctions naturelles de la protéine est intranucléaire. L'identification de la fonction des différentes régions conservées décrites dans cette étude pourrait permettre, à terme, de mieux comprendre le rôle de la protéine dans le mécanisme d'action du maribavir.

Lig e	Identification	Séquence	N°Genban k
1	HCMV-AD169	Human cytomegalovirus strain AD169 pUL27 (608 résidus)	NP_039961
2	HCMV-Merlin	Human cytomegalovirus strain Merlin pUL27 (608 résidus)	YP_081486
3	PoHV_4	Pongine herpesvirus 4 (Chimpanzee CMV) UL27 (640 résidus)	NP_612671
4	Rh46-Rhesus	Cercopithecine herpesvirus 8 Rh46 (579 résidus)	YP_068140
5	GPM27_MURID D_1	Murid herpesvirus 1 gpM27 (682 résidus)	YP_214040
6	R_27_MURID_ 2	Murid herpesvirus 2 pR27 (671 résidus)	NP_064132
7	U7_HHV7	Human herpesvirus 7 U7 (871 résidus)	YP_073749
8	U5_HHV_7	Human herpesvirus 7 strain JI U5 protein (865 résidus)	P52522
9	U7_HHV_6B	Human herpesvirus 6B U7 (903 résidus)	AAD496341
10	T27_TUPAIA	Tupaia herpesvirus T27 (636 résidus)	AAK57065

Tableau 13 : Séquences utilisées pour l'alignement de pUL27 et des homologues chez les herpes virus

*Tableau 14 : Polymorphisme naturel de la protéine pUL27
La séquence de référence est celle de la souche AD169, PDB N° CAA35426.*

Polymorphisme	Identifié dans cette étude	Identifié dans l'étude de Chou	Présent sur les souches de Référence
P10L	+	-	-
L11P	+	+	-
P12L	+	-	-
G22D	-	+	-
A58T	+	-	-
A83V	+	-	Toledo
A84V	+	+	-
K90R	+	+	Merlin
P95A	-	+	-
H97R	+	-	-
L133I	+	+	-
A134T	+	-	-
V135A	-	+	-
L221I	-	+	-
E229D	+	-	Toledo
D288N	-	+	-
N289D	+	+	Toledo/Davis/Merlin
D294N	+	+	Toledo/Towne/Merlin
H297Y	+	+	Merlin

Polymorphisme	Identifié dans cette étude	Identifié dans l'étude de Chou	Présent sur les souches de Référence
D298G	+	+	Toutes sauf AD169
N300G	+	+	Toledo/Davis/Merlin
D301N	-	+	-
P307L	+	+	Davis/Toledo
A309V	-	+	-
V310A	+	+	Davis/Toledo
H313Y	+	-	-
D351N	+	+	Davis/Toledo
S363W	-	-	Towne
I367V	+	+	Toledo/Towne/Davis
G421E	+	-	-
R465C	-	+	-
R531Q	-	+	-
T549A	-	-	Merlin
H557Q	+	+	Towne
A558V	+	+	-
A565T	+	+	Davis
P571T	+	-	-
H606Y	+	-	-

L'ensemble des séquences utilisées dans les diverses publications a été déposé dans la GenBank ; les numéros d'accèsion de ces séquences sont listés dans le tableau 15. Les séquences relatives à *UL89* seront disponibles en ligne en septembre 2006.

UL97	UL54	UL56	UL56	UL89	UL89
AAV85476	AAV88377	DQ228820	DQ228843	DQ485984	DQ486007
AAV87552	AAV00270	DQ228821	DQ228844	DQ485985	DQ486008
AAV49323	AAV00271	DQ228822	DQ228845	DQ485986	DQ486009
AAV49324	AAV00275	DQ228823	DQ228846	DQ485987	DQ486010
AAV49325	AAV00272	DQ228824	DQ228847	DQ485988	DQ486011
AAV49326	AAV00273	DQ228825	DQ228848	DQ485989	
AAV49327	AAV00274	DQ228826	DQ228849	DQ485990	
AAV49328	AAV00275	DQ228827	DQ228850	DQ485991	
AAV49329	AAV00276	DQ228828	DQ228851	DQ485992	
AAV49330	AAV00277	DQ228829	DQ228852	DQ485993	
AAV49331	AAV00278	DQ228830	DQ228853	DQ485994	
AAV49332	AAV00279	DQ228831	DQ228854	DQ485995	
AAV49333	AAV00280	DQ228832	DQ228855	DQ485996	
AAV49334	AAV00281	DQ228833	DQ228856	DQ485997	
AAV49335	AAV00282	DQ228834	DQ228857	DQ485998	
AAV49336	AAV00283	DQ228835	DQ228858	DQ485999	
AAV49337	AAV00284	DQ228836	DQ228859	DQ486000	
AAV49338	AAV00285	DQ228837	DQ228860	DQ486001	
AAV49339	AAV00286	DQ228838	DQ228861	DQ486002	
AAV49339	AAV00287	DQ228839	DQ228862	DQ486003	
	AAV00288	DQ228840	DQ228863	DQ486004	
	AAV00289	DQ228841	DQ228864	DQ486005	
	AAV00290	DQ228842			

Tableau 15 : Numéros d'accèsion des séquences décrites dans cette étude et déposées dans la GenBank

Discussion

L'émergence de la résistance du cytomégalovirus aux antiviraux reste un problème d'actualité chez les transplantés où elle participe à l'augmentation du nombre d'épisodes virémiques symptomatiques ou asymptomatiques débouchant généralement sur des maladies à CMV ou sur le rejet du greffon avec une élévation du risque de décès (Bhorade, Lurain *et al.* 2002). Il apparaît ainsi crucial de pouvoir diagnostiquer la résistance le plus précocement possible afin d'être en mesure d'adapter le traitement et d'éviter la survenue de complications graves.

A l'heure actuelle, différentes techniques permettent la détection des souches résistantes. Les techniques phénotypiques consistent en la mise en évidence du phénotype de résistance de la souche responsable de l'infection. Ces techniques permettent de mesurer le niveau de résistance et d'évaluer sa capacité répliquative, mais elles nécessitent l'isolement de la souche à étudier et des délais importants pour obtenir un stock viral suffisant. La forte corrélation entre le phénotype de résistance et le génotype justifie l'utilisation de tests de résistance basés sur le génotypage des isolats de CMV. Les techniques de génotypage ont pour avantage de réduire fortement les délais d'analyse et de permettre la détection de la souche résistante directement au site d'infection à partir de prélèvements cliniques.

Aussi apparaît-il intéressant de disposer d'un ensemble de techniques permettant l'étude des résistances à l'échelle génotypique, pour une détection rapide et exhaustive des mutations, et à l'échelle phénotypique pour une évaluation du niveau de résistance et de la capacité répliquative. Partant du constat de l'absence de techniques standardisées, rapides et reproductibles de génotypage et de phénotypage des souches, nous avons comme objectif le développement d'outils d'études génotypique et phénotypique des résistances du CMV aux antiviraux.

L'un des axes de notre travail a ainsi été de développer des méthodes simples, fiables et standardisables de détection et d'étude des résistances aux antiviraux actuels (GCV, CDV et PFA) mais aussi à certains antiviraux en développement (BDCRB, TCRB et MBV). Seul le séquençage permet de détecter l'ensemble des mutations connues ou inédites et d'analyser le polymorphisme naturel des protéines cibles des antiviraux. Les méthodes développées s'appuient ainsi sur le séquençage complet des gènes cibles de ces molécules ou impliqués dans leur mécanisme d'action : *UL97* pour le GCV et le MBV, *UL54* pour le GCV, le CDV et

le PFA, *UL27* pour le MBV, et *UL56*, *UL89* et *UL104* pour le BDCRB et le TCRB. Ne disposant pas à ce jour des dérivés benzimidazolés, notre approche concernant ces molécules s'est limitée à l'échelle génotypique.

Les méthodes de génotypage que nous avons développées répondent pleinement aux objectifs que nous nous étions fixés : elles sont rapides, fiables et reproductibles ; elles permettent l'étude des résistances à partir d'isolats mais aussi d'échantillons cliniques, rendant possible la détection des mutations directement au site d'infection ; elles nécessitent des délais courts pour l'obtention des résultats (2 à 3 jours) ; elles s'appuient sur une méthode d'analyse standardisée des résultats, grâce aux banques de données, qui simplifient la tâche des cliniciens ; elles peuvent s'adapter rapidement à la détection des nouvelles mutations de résistance, par simple remise à jour des banques de données ; et elles permettent l'analyse du polymorphisme naturel des protéines impliquées dans le mécanisme d'action des antiviraux (Article-1 et Article-5). Enfin, l'un des intérêts majeurs de nos méthodes de génotypage porte sur le système d'analyse des séquences. L'analyse est relativement simplifiée par le programme GeneLibrarian du logiciel GeneObject3.2™ (Bayer) et par l'utilisation des banques de données que nous avons constituées. Ce programme a la capacité d'aligner directement les contigs correspondant à chaque amorce et de compiler leur séquence en une séquence consensus qui sera à son tour alignée avec la séquence de référence et confrontée à la banque de données. Ce programme permet aussi d'éditer automatiquement les résultats sous forme d'un tableau dans lequel les mutations détectées sont classées en quatre catégories : mutations de résistance, mutations silencieuses (dont la connaissance peut avoir un intérêt dans le cadre d'études épidémiologiques), polymorphismes, et mutations localisées sur des sites de résistance mais non répertoriées comme des mutations de résistance.

Comme précédemment abordé, ces méthodes génotypiques ne permettent pas de mesurer le niveau de résistance des souches étudiées et leur capacité répliquative, dont la connaissance est pourtant importante pour le clinicien. Aussi, avons-nous souhaité coupler ces techniques à des méthodes phénotypiques qui permettent d'accéder à ces informations. Les délais importants et le manque de standardisation des techniques classiques, reposant sur la culture virale, nous ont conduits à rechercher des méthodes alternatives, pouvant associer rapidité et standardisation. C'est pourquoi **nous nous sommes tournés vers des méthodes permettant une étude phénotypique indirecte** qui ne s'appuie pas sur la culture virale. Concernant la résistance au GCV, une méthode de référence permettant la mesure rapide de l'effet des mutations de pUL97 sur le phénotype de résistance au ganciclovir était déjà disponible. Cette

méthode développée par Metzger et Michel permet de mesurer le niveau de phosphorylation du ganciclovir par la technique du virus vaccinal recombinant (Metzger, Michel *et al.* 1994). Associée à la mesure de la capacité d'autophosphorylation de pUL97 décrite par Michel et coll., cette méthode permet de mesurer rapidement et précisément le phénotype de résistance de la kinase pUL97 mutée, par comparaison à une kinase sauvage, et ainsi d'estimer le niveau de résistance de la souche portant cette mutation. Cette approche génotypique et phénotypique indirecte constitue un outil performant pour l'étude des mutations inédites détectées au sein de pUL97 comme le démontre l'Article-3 dans lequel nous avons, par cette approche, décrit une nouvelle mutation (délétion T601) et démontré son rôle dans la résistance au ganciclovir. Ce procédé sera appliqué à la mutation controversée H469Y décrite dans l'Article-1 et dans l'Article-5, et à la mutation inédite, T458I, décrite dans l'Article-5 après mutagénèse et clonage.

Sur le modèle de l'étude de *UL97*, nous avons souhaité associer notre méthode de génotypage de *UL54* à une technique phénotypique indirecte permettant d'apprécier la capacité répliquative et le niveau de résistance des souches portant les mutations étudiées. **Aussi avons-nous associé notre méthode de séquençage du gène *UL54* à une technique de mesure de l'activité polymérasique non radioactive développée au sein du laboratoire de Virologie de Lariboisière** (Article-6). Nous avons montré dans l'Article-6 que cette technique permettait de mesurer efficacement l'effet d'une mutation sur la capacité répliquative et sur la résistance au foscarnet. Notre travail s'inscrit ainsi dans une vision globale de la résistance : les méthodes de génotypage que nous avons développées permettent de détecter les mutations qui constituent le support génétique des résistances, et les méthodes phénotypiques développées par des laboratoires partenaires permettent de mesurer le rôle de ces mutations dans la résistance et dans l'activité des protéines qui les portent.

Toutefois, aucune de ces deux approches ne permet d'accéder aux supports moléculaires des résistances aux antiviraux, dont la connaissance est pourtant primordiale pour la compréhension des processus de résistance et pour le développement de nouvelles molécules ou l'amélioration des molécules actuelles. L'étude à l'échelle moléculaire des résistances nécessite en effet la connaissance de **la structure des protéines impliquées dans le mécanisme d'action des antiviraux, pour réaliser une approche par le biais de la relation structure/fonction**. Or, du fait de leur taille, ni la kinase pUL97, impliquée dans le mécanisme d'action du GCV, ni la polymérase pUL54, cible du GCV, du CDV et du PFA, n'ont pu être cristallisées. Aussi, avons-nous développé **des modèles tridimensionnels**

théoriques des sites catalytiques de pUL97 et pUL54 destinés à évaluer l'effet des mutations inédites sur la fonction de chacune de ces protéines. Alors qu'il était connu depuis les années 90 que pUL97 était une sérine/thréonine kinase, l'utilisation du logiciel Cn3D nous a permis de déterminer qu'elle appartient à la famille des **S_TKc serine/threonine kinases**. Nous appuyant sur la forte conservation des séquences en acides aminés et la structure tridimensionnelle du domaine catalytique des protéines de cette famille, nous avons construit un modèle théorique du site catalytique de l'activité kinase de pUL97. Ce modèle permet de déterminer la localisation des résidus d'intérêt dans, ou à proximité, du site catalytique afin d'évaluer l'effet théorique des mutations détectées par l'étude génotypique. Nous avons ainsi montré (Article-1) que les sites de substitution H469Y et N467D sont théoriquement localisés à l'extérieur du domaine catalytique, contrairement à la substitution M460I qui touche un résidu situé au cœur du site catalytique en contact direct avec le substrat de la kinase. Ceci nous a permis de suggérer que H469Y ne pouvait avoir que peu d'effet sur la structure du site catalytique et donc sur l'activité de pUL97 et sur la phosphorylation du GCV confirmant les observations de l'équipe de Lurain et coll., qui a décrit cette mutation chez un isolat sensible (Lurain, Weinberg *et al.* 2001). Par ailleurs, l'utilisation de notre modèle théorique nous a permis de souligner le rôle potentiel de la substitution T458I décrite dans l'Article-5, dans la résistance au ganciclovir du fait de sa localisation théorique au cœur du site catalytique.

L'application de cette démarche à l'étude de pUL54 nous a permis d'élaborer des **modèles des sites catalytiques polymérasique et endonucléasique de pUL54**. Nous avons utilisé ces modèles pour étudier diverses mutations décrites au cours de nos différentes études. Ainsi, avons-nous pu confirmer par ce modèle le rôle potentiel des mutations E756G et D717Y sur l'activité polymérase et la résistance au foscarnet du fait de leurs localisations respectives dans les régions conservées VI et II. Par ailleurs, nous avons suggéré que les substitutions S291P, A505V et K415R, respectivement localisées dans les domaines ExoI, ExoII et ExoIII, ne pouvaient avoir que peu d'effet sur la structure du domaine exonucléasique. Par contre, concernant l'association de mutations S291P/K415R, nous avons montré qu'une proline en position 291 pourrait provoquer un basculement du feuillet- β constituant le domaine exonucléasique ExoI et cet effet pourrait être accentué par une répulsion entre l'arginine R415 et deux autres résidus basiques localisés dans le feuillet- β (R420 et K426). Dans notre modèle du site polymérasique, le résidu S771 est localisé dans une boucle à l'extrémité des doigts de la polymérase (Article-6). La présence d'une proline à cette position doit probablement provoquer la constitution d'un coude modifiant significativement l'agencement

tridimensionnel des hélices constituant les doigts de la polymérase, expliquant ainsi la perte d'activité polymérasique associée à cette mutation. Enfin, nous avons montré que la substitution H495K pourrait être à l'origine d'une répulsion avec un résidu basique invariant (K811) localisé dans l'hélice P (hélice- α constituant la région III) du domaine polymérasique qui est impliquée dans la fixation des nucléotides et du foscarnet (Article-7). Cette répulsion probable explique ainsi certainement la légère diminution de l'activité polymérasique et la perte d'affinité pour le foscarnet associée à cette mutation. Les modèles théoriques que nous avons construits nous ont permis d'évaluer l'effet de certaines mutations sur la structure des domaines de la polymérase et donc sur l'activité polymérasique et sur la résistance au PFA. **Cependant cette démarche s'appuie sur des modèles théoriques et seule la structure de pUL54 permettra de définir l'impact réel des différentes mutations.** Toutefois la corrélation de nos résultats à ceux obtenus par l'approche phénotypique nous conforte dans notre démarche, d'autant que cette approche a été utilisée dans une étude récente, publiée en février 2006 (Tchesnokov, Gilbert *et al.* 2006), pour analyser l'effet de la substitution K805Q associée à une hypersensibilité au foscarnet. Ainsi, l'étude des mutations par une approche s'appuyant sur des modèles théoriques, apparaît-elle être une méthode complémentaire aux démarches traditionnelles pour l'étude des résistances.

Avec un tel outil diagnostic basé sur une approche globale de la résistance : analyse génotypique, analyse phénotypique et approche par le biais de la modélisation, le clinicien aura à sa disposition toutes les informations nécessaires pour mettre en place une stratégie thérapeutique adaptée et efficace. Grâce au système de génotypage (séquençage complet des gènes codant les protéines cibles ou impliquées dans le mécanisme d'action) il est possible de déterminer dans les **meilleurs délais** (de l'ordre de 36 heures) si la souche analysée porte des **mutations de résistance**, mais aussi de **répertorier les nouvelles mutations susceptibles d'induire des résistances**. **L'approche moléculaire par des outils bioinformatiques** permet d'évaluer immédiatement l'effet des mutations touchant des résidus localisés dans, ou à proximité, des domaines fonctionnels, sur la structure des sites catalytiques. Enfin les **méthodes phénotypiques** (mesure du niveau de phosphorylation du ganciclovir et d'autophosphorylation de pUL97 d'une part, et mesure de l'activité polymérasique d'autre part) permettent de mesurer l'effet de la mutation sur l'efficacité de l'antiviral ou sur la fonction de la protéine portant la mutation. Cette approche globale de la résistance sera utilisée dans notre laboratoire, en partenariat avec d'autres équipes, pour la surveillance de la

résistance du CMV dans le cadre du Centre National de Référence CytomégaloVirus qui vient de se constituer.

Une telle approche nécessite toutefois la connaissance de la variabilité intra-espèces par identification du polymorphisme naturel et de la conservation inter-espèces des protéines étudiées par identification des régions conservées et des domaines fonctionnels. Les régions conservées de pUL97 et pUL54 étaient déjà connues lorsque nous avons initié nos travaux et la connaissance du polymorphisme naturel de ces protéines avait bénéficié d'études réalisées par différentes équipes américaines. Nous avons toutefois souhaité **étudier le polymorphisme naturel de ces protéines sur les souches circulant en France et nous, avons montré l'existence de divergences phylogéniques mineures** dépendant de l'origine géographique des souches. Cette connaissance du polymorphisme naturel des protéines et des régions conservées est utile à deux niveaux : d'une part, elle permet d'identifier des régions variables au sein de ces protéines, qui sont probablement des régions non fonctionnelles et dont la connaissance est importante pour l'étude des mutations inédites ; d'autre part, elle permet de cribler plus rapidement les mutations et facilite ainsi l'identification de mutations inédites potentiellement impliquées dans la résistance.

Concernant les **cibles des antiviraux en développement**, hormis pour pUL97 et une étude pour pUL27, aucune donnée n'était disponible quant au polymorphisme naturel de ces cibles. De plus, les domaines fonctionnels de ces protéines n'avaient pas été identifiés. Aussi avons-nous jugé intéressant d'étudier le polymorphisme naturel et les régions conservées de ces protéines avant la mise sur le marché de benzimidazolés dextrogyres ou lévogyres. Les objectifs de cette étude sont, à court terme, de faciliter l'identification des résistances à ces molécules une fois qu'elles seront utilisées pour le traitement des infections à CMV, et plus particulièrement pour le maribavir, et à plus long terme, d'améliorer la compréhension de la fonction des protéines cibles pour faciliter le développement de nouvelles molécules.

A l'instar de pUL97 et pUL54, nous avons tout d'abord développé des outils rapides et standardisables de génotypage des gènes *UL27*, *UL56*, *UL89* et *UL104*, couplés à des banques de données évolutives, afin de **disposer en amont d'un outil permettant d'identifier les résistances au maribavir ou aux dérivés benzimidazolés dextrogyres** lorsque ces molécules seront disponibles en thérapeutique et que les résistances ne manqueront pas d'apparaître. Nous avons par ailleurs utilisé ces outils pour effectuer une étude préliminaire du

polymorphisme naturel des protéines pUL27, pUL56, pUL89 et pUL104. Nous avons ainsi identifié plusieurs mutations présentes sur des isolats issus de patients naïfs correspondant à ce titre à des polymorphismes. Pour pUL56, l'analyse de ces polymorphismes a permis l'identification de deux régions variables dont une région riche en résidus glycine et sérine correspondant certainement à des régions non fonctionnelles de la protéine.

En parallèle, nous avons comparé la séquence en acides aminés de pUL56 et pUL89 avec celle de leurs homologues chez les herpesvirus humains et animaux et, nous avons de la sorte identifié les régions conservées de ces protéines. L'analyse de ces régions conservées et de la séquence primaire de ces protéines nous a permis de déterminer les fonctions de pUL56 et pUL89 et d'identifier plusieurs domaines fonctionnels.

Nous avons ainsi montré que **pUL56 appartient à la classe des "DNA junction resolvases"** puisqu'elle possède un domaine fonctionnel, que nous avons nommé **pUL56-ZF (pour pUL56 zinc finger), qui correspond au site catalytique endonucléasique de cette classe de recombinases** (Article-8). Par comparaison de la séquence de ce domaine hautement conservé avec la séquence de la protéine gp49 EndoVII du phage T4 (*gp49 packaging and recombination endonuclease VII*), nous avons montré que le domaine pUL56-ZF représente probablement le site de dimérisation de pUL56 et que la dimérisation antiparallèle de deux domaines pUL56-ZFs issus de deux monomères de pUL56s constituerait le site catalytique endonucléasique du complexe terminase et le site de fixation et de reconnaissance des séquences *pac*. A l'image des *DNA junction resolvases*, la dimérisation de pUL56-ZF est probablement un prérequis à l'acquisition de l'activité nucléasique. Nous avons identifié un cluster de résidus acides contenant un résidu aspartate conservé (D239) probablement impliqué dans cette activité comme précédemment démontré sur plusieurs *DNA junction resolvases* (Pöhler, Giraud-Panis *et al.* 1996; Birkenbihl and Kemper 1998; Birkenbihl and Kemper 1998). Ces données, par comparaison aux connaissances concernant les *DNA junction resolvases* et plus particulièrement gp49 EndoVII, nous ont ainsi permis de mieux appréhender la fonction de pUL56 au cours de l'encapsidation de l'ADN viral. Par ailleurs, l'existence de la mutation de résistance Q204R, qui touche un résidu localisé dans la boucle du doigt de zinc de pUL56-ZF, nous a conduits à suggérer que le mécanisme d'action des benzimidazolés dextrogyres pouvait impliquer, outre l'interaction entre pUL56 et pUL104 comme récemment démontré (Dittmer, Drach *et al.* 2005), une inhibition de la reconnaissance spécifique des séquences *pac* par pUL56-ZF, provoquant une perturbation de l'activité nucléasique comme démontré par McVoy et Nixon (McVoy and Nixon 2005). Cette

hypothèse est en accord avec les connaissances concernant la résistance aux dérivés benzimidazolés dextrogyres. Une mutation de résistance à ces molécules a été décrite au sein de pUL89 ainsi qu'une mutation compensatoire au sein de pUL104. Ceci suggère que le mécanisme d'action de ces molécules s'appuie sur l'inhibition d'un site formé par un complexe oligomérique constitué par ces trois protéines (dimère de pUL56s + pUL89 + pUL104). Des expérimentations sont en cours afin de vérifier la capacité de pUL56-ZF à se dimériser, et à l'aptitude du dimère à reconnaître spécifiquement les séquences *pac* et à se lier au BDCRB et au TCRB. A cet effet, nous avons développé un protocole de production et de purification de peptides recombinants. Ce protocole est actuellement utilisé pour produire différents peptides dédiés à l'étude de la structure et de la fonction de pUL56-ZF et à l'identification des résidus impliqués dans cette fonction.

Concernant pUL89, l'analyse de la séquence primaire et des régions conservées que nous avons identifiées nous a permis de décrire plusieurs domaines fonctionnels impliqués dans **l'activité ATPasique de pUL89**, comme précédemment décrit (Mitchell, Matsuzaki *et al.* 2002). Nous avons par ailleurs décrit des domaines probablement impliqués dans **l'interaction avec l'ADN, dans l'activité nucléasique, et dans la fixation spécifique à la protéine portail pUL104**. La compilation de ces résultats montre que pUL89 porte tous les motifs d'acides aminés permettant la constitution d'un site catalytique ATPasique (ATPase motor) et permet de classer pUL89 parmi les hélicases de la famille des *DEXDc, DEAD like helicases* (Article-9).

L'analyse de ces résultats nous a conduits à nous interroger quant à la signification biologique de l'appartenance de pUL56 à une classe de recombinases et de pUL89 à une famille d'hélicases. Les *DNA junction resolvases* sont des recombinases qui clivent l'ADN au niveau des jonctions de Holliday, qui sont des repliements de l'ADN formant des structures cruciformes (Holliday 1964). Ces repliements se constituent à partir de séquences riches en nucléotides A et T et permettent le clivage spécifique de l'ADN et sa recombinaison. Or les séquences *a*, qui contiennent les signaux d'encapsidation (séquences *pac*) et au sein desquelles est réalisé le clivage de l'ADN lors de l'encapsidation, sont aussi des séquences riches en nucléotides A et T. Par ailleurs, McVoy et Ramnarain ont mis en évidence la proximité existant entre les processus d'encapsidation et d'inversion des génomes (McVoy and Ramnarain 2000). L'inversion des génomes résulte d'un processus de recombinaison entre les segments uniques longs et uniques courts au niveau des séquences *a*. La signification biologique de cette inversion n'est pas encore connue. Considérant l'appartenance de pUL56 à la famille des *DNA junction resolvases*, le lien étroit entre les processus d'encapsidation et de

recombinaison, les similitudes entre les séquences *a* et les séquences riches en nucléotides A et T impliquées dans la constitution des jonctions de Holliday, et les connaissances concernant les processus de clivage des jonctions de Holliday, nous émettons l'hypothèse selon laquelle l'inversion du génome du CMV résulterait du mode de clivage des unités de génomes qui pourrait faire appel à un processus de recombinaison. Le processus de clivage pourrait ainsi impliquer pUL56 mais aussi pUL89 de par ses domaines nucléasiques, mais aussi de par sa fonction hélicase. La protéine pUL89 pourrait permettre la stabilisation avant et après le clivage nucléasique. Toutes ces hypothèses méritent évidemment d'être vérifiées par des expérimentations supplémentaires, et notamment la vérification de l'impact du BDCRB et du TCRB sur l'inversion des génomes. Les travaux de McVoy et Nixon ont montré que ces agents perturbaient le clivage des génomes en provoquant la libération de génomes trop longs (*monomer(+)* DNA) ou trop courts (*left-end truncated DNA* ou *monomer(-)* DNA) (McVoy and Nixon 2005). Si nos hypothèses concernant l'activité recombinase de pUL56 et son rôle dans l'inversion des génomes sont vérifiées, l'ajout de BDCRB et de TCRB devrait perturber l'inversion des segments uniques au même titre que le clivage. Le séquençage des régions entre les différents segments et aux extrémités des génomes libérés par le clivage des concatémères en présence de ces molécules, permettrait de vérifier si le clivage sur des sites aspécifiques, engendrant la constitution des *monomères(+)* et des *monomères(-)*, est aussi associé à une inversion sur ces même sites.

Nos travaux ont ainsi permis de déterminer la fonction des terminases pUL56 et pUL89, mais aussi d'émettre des hypothèses quant au processus d'encapsulation et au mécanisme d'action des dérivés benzimidazolés. L'étude de pUL104 et pUL27 a permis l'identification de plusieurs régions conservées dont la fonction n'a pu être élucidée. De la même manière, hormis pUL56-ZF, nous n'avons pu identifier la fonction de toutes les régions conservées de pUL56. Des expérimentations s'appuyant sur la production de protéines recombinantes, délétées de certains motifs d'acides aminés invariants localisés dans ces régions, et sur l'analyse de l'effet de ces mutations sur des souches de CMV transformées avec ces protéines recombinantes, permettront de déterminer les fonctions de ces différentes régions et d'identifier les résidus indispensables à ces fonctions.

Conclusion - Perspectives

Nos travaux s'inscrivent ainsi dans une vision globale de la résistance du cytomégalo virus humain aux inhibiteurs de la synthèse ou de la maturation de l'ADN viral. Concernant les antiviraux actuels, nous avons développé un ensemble d'outils standardisés, rapides, fiables et reproductibles, permettant la détection des résistances et l'étude des mutations de résistance à l'échelle génotypique, phénotypique et moléculaire. La méthode de génotypage de *UL97*, couplée au génotypage de *UL27*, sera facilement adaptable à la surveillance des résistances au maribavir. Concernant les dérivés benzimidazolés D-ribonucléosidiques, outre le développement des méthodes de génotypage de *UL56*, *UL89* et *UL104*, nous avons émis des hypothèses quant à la fonction propre de pUL56 et pUL89 au cours de l'encapsidation, mais aussi quant au mécanisme d'action de ces molécules. Un certain nombre de travaux décrits dans cette thèse seront poursuivis en collaboration avec l'Institut de Pharmacologie Chimique et Génétique de l'Université Paris V, et le laboratoire de Virologie de l'Hôpital Lariboisière, dans le cadre de deux thèses d'université (Sébastien Hantz, Limoges, et Anthony Couvreur, Paris), et d'un Master professionnel (Stéphanie Stuppfler, Limoges).

Nous envisageons par ailleurs d'étendre cette approche à l'étude des résistances aux dérivés flavonoïdes, qui constituent une nouvelle classe de molécules pour le traitement des infections à CMV.

Références Bibliographiques

A

- Adler, S. P., S. E. Starr (1995). "Immunity induced by primary human cytomegalovirus infection protects against secondary infection among women of childbearing age." J. Infect. Dis. **171** : 26-32.
- Alain, S., M. C. Mazon, J. M. Pepin, J. F. Bergmann, R. Narwa, L. Raskine, and M. J. Sanson-Le Pors (1995). "Value of a new rapid non-radioactive sequencing method for analysis of the cytomegalovirus UL97 gene in ganciclovir-resistant strains." J. Virol Methods **51** : 241-51.
- Alain, S., P. Honderlick, et al. (1997). "Failure of ganciclovir treatment associated with the selection of a ganciclovir-resistant strain in a lung transplant recipient." Transplantation **63** : 1533-1556.
- Alain, S. and M. C. Mazon (2001). "Infections à cytomégalo virus." EMC **8-052-C-10**.
- Alford, C. A. and W. J. Britt (1990). "Cytomégalo virus." Fields BN, Knipe DM eds. Virology : Raven Press, New York; 1981-2010.
- Anders, D. G. and L. A. McCue (1996). "The human cytomegalovirus genes and proteins required for DNA synthesis." Intervirology **39** : 378-388.
- Ang, C. W., B. C. Jacob, et al. (2000). "Cross-reactive antibodies against GM2 and CMV-infected fibroblasts in Guillain-Barré syndrome." Neurology **54** : 1453-1458.
- Appleton, B. A., J. Brooks, et al. (2005). "The crystal structure of the cytomegalovirus DNA polymerase subunit UL44 with the C-terminus from the catalytic subunit: differences in structure and function relative to unliganded UL44." J. Biol. Chem.

B

- Batadaram, K., C. Dabrowski, et al. (1994). "Transcriptional analysis of the region of the herpes simplex virus type 1 genome containing the UL8, UL9 and UL10 genes and identification of a novel delayed-early gene product, OPBC." J. Virol. **68** : 4251-4261.
- Beard, P. M., N. S. Taus, et al. (2002). "DNA cleavage and packaging proteins encoded by genes UL28, UL15, and UL33 of Herpes Simplex Virus type 1 form a complex in infected cells." J. Virol. **76** : 4785-4791.
- BenMohamed, L., R. Krishnan, et al. (2000). "Induction of CTL response by a minimal epitope vaccine in HLA A*0201/DR1 transgenic mice: dependence on HLA class II restricted T(H) response." Hum. Immunol. **61** : 764-779.

- Bernard, A., L. Blanco, et al. (1989). "A conserved 3'-5' exonuclease active site in procaryotic and eukaryotic DNA polymerase." Cell **59** : 219-228.
- Bhorade, S. M., N. S. Lurain, et al. (2002). "Emergence of ganciclovir-resistant cytomegalovirus in lung transplant recipients." J. Heart Lung Transplant. **21** : 1274-1282.
- Birkenbihl, R. P. and B. Kemper (1998). "Endonuclease VII has two DNA-binding sites each composed from one N- and one C-terminus provided by different subunits of the protein dimer." EMBO J. **17**(15): 4727-4734.
- Birkenbihl, R. P. and B. Kemper (1998). "Localization and characterization of the dimerization domain of holliday structure resolving endonuclease VII of phage T4." J. Mol. Biol. **280** : 73-83.
- Biron, K. K., R. J. Harvey, et al. (2002). "Potent and selective inhibition of human cytomegalovirus replication by 1263W94, a benzimidazole L-ribonucleoside with a unique mode of action." Antimicrob. Agents Chemother. **46** : 2365-2373.
- Biron, K. K., S. Stanat, et al. (1985). "Metabolic activation of the nucleoside analogue 9-[2-hydroxy-1-(hydroxymethyl)ethoxy]methyl]guanine in human diploid fibroblasts infected with human cytomegalovirus." Proc. Natl. Acad. Sci. USA **82** : 2473-2477.
- Blot, F., C. Mayaud, et al. (1995). "Cytomegalovirus pneumopathies. What role should be given to cytomegaloviruses isolated from blood and bronchoalveolar lavage fluid in AIDS and from organs and bone marrow grafts." Rev. Pneumol. Clin. **51** : 309-320.
- Boeckh, M. (1999). "Management of cytomegalovirus infection in blood and marrow transplant recipients." Antiviral Chemotherapy - New York : Plenum Press **5** : 89-109.
- Bogner, E. (2002). "Human cytomegalovirus terminase as a target for antiviral chemotherapy." Rev. Med. Virol. **12** : 115-127.
- Bogner, E., K. Radsak, et al. (1998). "The gene product of human cytomegalovirus open reading frame UL56 binds the pac motifs and has specific nuclease activity." J. Virol. **72** : 2259-2264.
- Boivin, G., C. Gilbert, et al. (2001). "Rate of emergence of cytomegalovirus (CMV) mutations in leukocytes of patients with acquired immunodeficiency syndrome who are receiving valganciclovir as induction and maintenance therapy for CMV retinitis." J. Infect. Dis. **184** : 1598-1602.
- Bopanna, S. P., K. B. Fowler, et al. (1999). "Symptomatic congenital cytomegalovirus infection in infants born to mothers with preexisting immunity to cytomegalovirus." Pediatrics **104** : 55-60.
- Bopanna, S. P., R. F. Pass, et al. (1992). "Symptomatic congenital cytomegalovirus infection: neonatal morbidity and mortality." Pediatr. Infect. Dis. **11** : 93-99.

Bourgeois, C., B. Rocha, et al. (2002). "A role for CD40 expression on CD8+ T cells in the generation of CD8+ T cell memory." Science **297** : 2060-2063.

Bridges, K. G., Q. Hua, et al. (2000). "Secondary structure and structure-activity relationships of peptides corresponding to the subunit interface of herpes simplex virus DNA polymerase." J. Biol. Chem. **274** : 472-478.

Britt, W. J., L. Vulger, et al. (1990). "Cell surface expression of human cytomegalovirus (HCMV) gp55-116 (gB): use of HCMV recombinant vaccinia virus infected cells in analysis of the human neutralizing antibody response." J. Virol. **64** : 1079-1085.

Bronsther, O., L. Makowka, et al. (1988). "Occurrence of cytomegalovirus hepatitis in liver transplant patients." J. Med. Virol. **24** : 423-434.

C

Cha, T. A., E. Tom, et al. (1996). "Human cytomegalovirus clinical isolates carry at least 19 genes not found in laboratory strains." J. Virol. **70** : 78-83.

Chambers, J., A. Angulo, et al. (1999). "DNA microarrays of the complex human cytomegalovirus genome: profiling kinetic class with drug sensitivity of viral gene expression." J. Virol. **73** : 5757-5766.

Chee, M. S., A. T. Bankier, et al. (1990). "Analysis of the protein-coding content of the sequence of human cytomegalovirus strain AD169." Curr. Top. Microbiol. Immunol. **154** : 125-69.

Chee, M. S., G. L. Lawrence, et al. (1989). "Alpha-, beta, and gammaherpesviruses encode a putative phosphotransferase." J. Gen. Virol. **70** : 1151-1160.

Chen, J., J. C. Drach, et al. (2003). "Convergent synthesis of polyhalogenated quinoline C-Nucleosides as potential antiviral agents." J. Org. Chem. **68** : 4170-4178.

Cheng, Y. C., S. P. Grill, et al. (1983). "Metabolism of 9-(1,3-dihydroxi-2-prpoxyméthyl)-guanine, a new anti-herpesvirus compound, in herpes simplex virus-infected cells." J. Biol. Chem. **258** : 12460-12464.

Chien, T. C., S. S. Saluja, et al. (2004). "Synthesis and evaluation of polyhalogenated imidazole nucleosides: dimensional analogues of 2,5,6-trichloro-1-(Beta-D-ribofuranosyl) benzimidazole." J. Med. Chem **47** : 5743-5752.

Chou, S. (1999). "Antiviral drug resistance in human cytomegalovirus." Transplant. Infect. Dis. **1** : 105-114.

Chou, S., S. Guentzel, et al. (1995). "Frequency of UL97 phosphotransferase mutations related to ganciclovir resistance in clinical cytomegalovirus isolates." J. Infect. Dis. **172** : 239-242.

Chou, S., N. Lurain, et al. (2003). "Viral DNA polymerase mutations associated with drug resistance in human cytomegalovirus." J. Infect. Dis. **188** : 32-39.

- Chou, S., N. Lurain, et al. (1999). "Interstrain variation of the human cytomegalovirus DNA polymerase sequence and its effect on genotypic diagnosis of antiviral drug resistance" Antimicrob. Agents Chemother. **43** : 1500-1502.
- Chou, S., G. I. Marousek, et al. (1997). "Evolution of mutations conferring multidrug resistance during prophylaxis and therapy for cytomegalovirus disease." J. Infect. Dis. **176** : 786-789.
- Chou, S., G. I. Marousek, et al. (2004). "Mutations in the human cytomegalovirus UL27 Gene that confer resistance to maribavir." J. Virol. **78**(13) : 7124-7130.
- Chou, S., R. H. Waldemer, et al. (2002). "Cytomegalovirus UL97 phosphotransferase mutations that affect susceptibility to ganciclovir." J. Infect. Dis. **185** : 162-169.
- Chrisp, P. and S. P. Clissold (1991). "Foscarnet: a review of its antiviral activity, pharmacokinetic properties, and therapeutic use in immunocompromized patients with cytomegalovirus retinitis." Drugs **41** : 104-129.
- Chulay, J., K. K. Biron, et al. (1999). "Development of novel benzimidazole ribonucleoside compounds for treatment of cytomegalovirus disease." Antiviral Therapy 5: New direction for clinical applications and research ; Plenum Publishers, New York: 129-134.
- Churchill, M. A., J. A. Zaia, et al. (1987). "Quantification of human cytomegalovirus in lungs from bone marrow transplant recipients with interstitial pneumonia." J. Infect. Dis. **155** : 501-509.
- Cihlar, T. and M. S. Chen (1996). "Identification of enzymes catalysing two-step phosphorylation of cidofovir and the effect of cytomegalovirus infection on their activities in host cells." Mol. Pharmacol. **50**: 1502-1510.
- Cihlar, T., M. D. Fuller, et al. (1997). "Expression of the catalytic subunit (UL54) and the accessory protein (UL44) of human cytomegalovirus DNA polymerase in a couple in vitro transcription/translation system." Protein Express. Purif. **11** : 209-218.
- Cole, R. and A. G. Kuttner (1926). "A filtrable virus present in the submaxillary glands of guinea pigs." J. Exp. Med. **44** : 855-873.
- Colinon, R. and S. Minjolle (2002). "Biologie du cytomegalovirus." Cytomegalovirus - Marie.Christine Mazon - Elsevier Guides Médi BIO : 3-42.
- Crumpeker, C. S. (1996). "Ganciclovir." Drug Ther. **335** : 721-729.

D

- Dankner, W. M., J. A. McCutchan, et al. (1990). "Localization of human cytomegalovirus in peripheral blood leukocytes by *in situ* hybridization." J. Infect. Dis. **161** : 31-36.
- Davison, A. J. (1992). "Channel catfish virus: a new type of herpesvirus." Virology **186** : 9-14.

- Davison, A. J. and J. E. Scott (1986). "The complete sequence of varicella-zoster virus." J. Gen. Virol. **67**(9) : 1759-1816.
- Demmler, G. J. (1996). "Congenital cytomegalovirus infection and disease." Adv. Pediatr. Inf. Dis. **11** : 135-162.
- Demmler, G. J., M. D. Yow, et al. (1987). "Nosocomial cytomegalovirus infections within two hospitals caring for infants and children." J. Infect. Dis. **156** : 9-16.
- Derbyshire, V., P. S. Freemont, et al. (1988). "Genetic and crystallographic studies of the 3'-5' exonuclease site of DNA polymerase I." Science **240** : 199-201.
- Dittmer, A. and E. Bogner (2005). "Analysis of the quaternary structure of the putative HCMV portal protein pUL104." Biochemistry **44** : 759-765.
- Dittmer, A., J. C. Drach, et al. (2005). "Interaction of the putative human cytomegalovirus portal protein pUL104 with the large terminase subunit pUL56 and its inhibition by benzimidazole-D-ribonucleosides." J Virol. **79**(23) : 14660-14667.
- Dittmer, A. and E. S. Mocarski (1997). "Human cytomegalovirus infection inhibits G₁/S transition." J Virol. **71** : 1629-1634.
- Dorsky, D. I. and C. Crumpacker (1988). "Expression of herpes simplex virus type 1 DNA polymerase gene by *in vitro* translation and effects of gene deletions on activity." J. Virol. **62** : 3224-3232.
- Drew, W. L., R. Miner, et al. (1993). "Antiviral susceptibility testing of cytomegalovirus: criteria for detecting resistance to antivirals." Clin. Diagn. Virol. **1** : 179-185.
- Ducancelle, A., J. Gravis, et al. (2005). "Phenotypic characterisation of cytomegalovirus DNA polymerase: a method to study cytomegalovirus isolates resistant to foscarnet." J. Virol Methods **125** : 145-151.
- Ducancelle, A. S., A. S. Belloc, et al. (2004). "Comparison of sequential cytomegalovirus isolates in a patient with lymphoma and failing antiviral therapy." J. Clin. Virol. **29** : 241-247.
- Dunn, H. S., D. J. Haney, et al. (2002). "Dynamic of CD4 and CD8 T cells responses in cytomegalovirus in healthy human donors." J. Infect. Dis. **186** : 15-22.
- Durandy, A. (2001). "Anti-B cell and anti-cytokine therapy for the treatment of post-transplant lymphoproliferative disorder: past, present, and future." Transplant. Infect. Dis. **3** : 104-113.
- Dussaix, E. and Y. Brossard (1996). « Les cytomégalovirus » - Les virus transmissibles par le sang, John Libbey Eurotext : Montronge. 187-203

E

- Elek, S. D. and H. Stern (1974). "Development of a vaccine against mental retardation caused by cytomegalovirus infection *in utero*." Lancet **I** : 1-5.
- Emery, V. C. (2001). "Progress in understanding cytomegalovirus drug resistance." J. Clin. Virol. **21** : 223-228.
- Emery, V. C. and P. D. Griffiths (2000). "Prediction of cytomegalovirus load and resistance patterns after antiviral chemotherapy." Proc. Natl. Acad. Sc. USA **97** : 8039.
- Erice, A. (1999). "Resistance of cytomegalovirus to antiviral drugs." Clin. Microbiol. Rev. **12** : 286-297.
- Erice, A., N. Borrell, et al. (1998). "Ganciclovir susceptibilities and analysis of UL97 region in cytomegalovirus isolates from bone marrow recipients with CMV disease after antiviral prophylaxis." J. Infect. Dis. **178** : 531-534.
- Erice, A., C. Gil-Roda, et al. (1997). "Antiviral susceptibilities and analysis of UL97 and DNA polymerase sequences of clinical cytomegalovirus isolates from immunocompromised patients." J. Infect. Dis. **175** : 1087-1092.
- Erice, A., C. S., et al. (1989). "Progressive disease due to ganciclovir-resistant cytomegalovirus in immunocompromised patients." N. Engl. J. Med. **320** : 289-293.
- Evans, T. G., Wloch M, et al. (2004). "Phase 1 trial of a bivalent, formulated plasmid DNA CMV vaccine for use in the transplant population " 44th Interscience Conference on Antimicrobial Agents and Chemotherapy (ICAAC), Washington DC: (abstract).
- Evers, D., G. Komazin, et al. (2004). "Inhibition of human cytomegalovirus replication by benzimidazole nucleosides involves three distinct mechanisms." Antimicrob. Agents Chemother. **48**(10) : 3918-3927.
- Evers, D. L., X. Wang, et al. (2004). "Cellular stress and signal transduction responses to human cytomegalovirus infection." Microbes and Infection **6**: 1084-1093.

F-G

- Field, A. K., M. E. Davies, et al. (1983). "9-(1,3-dihydroxi-2-propoxyméthyl)-guanosine : a selective inhibitor of herpes group virus replication." Proc. Natl. Acad. Sci. USA **8** : 4139-4143.
- Fishman, J. A. and R. H. Rubin (1998). "Infection in organ trasplant recipients." N. Engl. J. Med. **338** : 1741-1749.
- Freemont, P. S., J. M. Friedman, et al. (1988). "Cocrystral structure of an editing complex of klenow fragment with DNA." Proc. Natl. Acad. Sci. USA **85** : 8924-8928.
- Gandhi, M. K. and R. Khanna (2004). "Human cytomegalovirus: clinical aspects, immune regulation, and emerging treatments." The Lancet infectious deseases **4** : 725-738.
- Gardner, A. F. and W. E. Jack (1999). "Determinants of nucleotide sugar recognition in an archaeon DNA polymerase." Nucleic Acids Res. **27** : 2545-2553.
- Gaytant, M. A., E. A. Steegers, et al. (2002). "Congenital cytomegalovirus infection: review of the epidemiology and outcome." Obstet. gynecol. Surv. **57** : 245-256.
- Gérard, L. and D. Salmon (1999). "Thérapeutique." Les herpèsvirus humains Elsevier, Paris (1ère édition).
- Germa, G., E. Percivalle, et al. (2005). "Dendritic-cell infection by human cytomegalovirus is restricted to strains carrying functional UL131-128 genes and mediates efficient viral antigen presentation to CD8+ T cells." J. Gen. Virol. **86** : 275-284.
- Gerna, G., F. Baldanti, et al. (2004). "Pathogenesis of human cytomegalovirus infection and cellular targets." Human Immunol. **65** : 381-386.
- Gerna, G., M. Zavattoni, et al. (1998). "Circulating cytomegalic endothelial cells are associated with high human cytomegalovirus (HCMV) load in AIDS patients with late-stage disseminated HCMV disease." J. Med. Virol. **55** : 64-74.
- Gershburg, E., K. Hong, et al. (2004). "Effects of maribavir and selected indolocarbazoles on Epstein-Barr Virus protein kinase BGLF4 and on viral lytic replication." Antimicrob. Agents Chemother. **48**(5) : 1900-1903.
- Gibbs, J. S., K. F. Chiou, et al. (1988). "Identification of amino acids in herpes simplex virus DNA polymerase involved in substrate drug recognition." Proc. Natl. Acad. Sci. USA **85** : 6672-6676.
- Giesen, K., K. Radsak, et al. (2000). "The potential terminase subunit pUL56 of HCMV is translocated into the nucleus by its own NLS and interacts with importin-alpha." J. Gen. Virol. **81** : 2231-2244.
- Giesen, K., K. Radsak, et al. (2000). "Targeting the gene product encoded by ORF UL56 of human cytomegalovirus into viral replication centers." FEBS Lett. **471** : 215-218.
- Gilbert, C. and G. Boivin (2005). "Human cytomegalovirus resistance to antiviral drugs." Antimicrob. Agents Chemother. **49**(3) : 873-883.

Gonczol, E., Berenski K, et al. (1995). "Preclinical evaluation of an ALVAC (canarypox) human cytomegalovirus glycoprotein B vaccine candidate." Vaccine **13** : 1080-1085.

Gonczol, E., J. Ianacone, et al. (1989). "Humoral immune response to cytomegalovirus Towne vaccine strain and to Toledo low-passage strain." J. Infect. Dis. **159** : 851-859.

Grassi, M., F. Clerici, et al. (1998). "Nicrogiol nodular encephalitis and ventriculoencephalitis due to cytomegalovirus infection in patients with AIDS: two distinct clinical patterns." Clin. Infect. Dis. **27** : 504-508.

Greijer, A. E., J. M. van de Commert, et al. (1999). "Molecular fine-specificity analysis of antibody responses to human cytomegalovirus and design of novel synthetic-peptide-based serodiagnostic assays." J. Clin. Microbiol. **37** : 179-188.

H-I

Hahn, G., R. Jores, et al. (1998). "Cytomegalovirus remains latent in a common precursor of dendritic and myeloid cell." Proc. Natl. Acad. Sci. USA **95** : 3937-3942.

Hahn, G., M. G. Revello, et al. (2004). "Human cytomegalovirus UL131-128 genes are indispensable for virus growth in endothelial cells and virus transfer to leukocytes." J. Virol. **78** : 10023-10033.

Hamzeh, F. and P. Lietman (1991). "Intranuclear accumulation of subgenomic noninfectious human cytomegalovirus DNA in infected cells in the presence of ganciclovir." Antimicrob. Agents Chemother. **35** : 1818-1823.

Hanks, S. K., A. M. Quinn, et al. (1988). "The protein kinase family: conserved features and deduced phylogeny of the catalytic domains." Science **241** : 42-52.

Hirt, B. (1967). "Selective extraction of polyoma DNA from infected mouse cell culture." J. Mol. Biol. **26** : 365-369.

Hitchcock, M. J., H. S. Jaffe, et al. (1996). "Cidofovir, a new agent with potent anti-herpesvirus activity." Antivir. Chem. Chemother. **7** : 115-127.

Ho, M. (1990). "Epidemiology of cytomegalovirus infection." Rev. Infect. Dis. **12** : 701-710.

Holliday, R. (1964). "A mechanism for gene conversion in fungi." Genet. Res. **5** : 282-304.

Houhou-Fidou, N., M. C. Mazon, et al. (1998). "Comparaison de la sensibilité *in vitro* au cidofovir et au ganciclovir des isolats cliniques de cytomegalovirus humain." Pathol. Biol. **46** : 420-422.

Hwang, J. S. and E. Bogner (2002). "ATPase activity of the terminase subunit pUL56 of human cytomegalovirus." J. Biol. Chem. **277** : 6943-6948.

Ibanez, C. E., R. Schrier, et al. (1991). "Human cytomegalovirus productively infects primary differential macrophages." J. Virol. **65** : 6581-6588.

Ijichi, O., D. Michel, et al. (2002). "GCV resistance due to the mutation A594P in the cytomegalovirus protein UL97 is partially reconstituted by a second mutation at D605E." Antiviral. Res. **53** : 135-142.

Imbert, B. M. (2002). "Epidémiologie des infections à cytomégalovirus." Edition Scientifique et médicales, Elsevier, Paris Collection Medi/Bio: 43-50.

Irmiere, A. and W. Gibson (1983). "Isolation and characterization of a noninfectious virion-like particle released from cells infected with human strains of cytomegalovirus." Virology **130** : 118-133.

J

Jabs, D. A., C. Enger, et al. (1998). "Cytomegalovirus retinitis and viral resistance: ganciclovir resistance." J. Infect. Dis. **177** : 770-773.

Jabs, D. A., C. Enger, et al. (1998). "Incidence of foscarnet resistance and cidofovir resistance in patients treated for cytomegalovirus retinitis." Antimicrob. Agents Chemother. **42** : 2240-2244.

Jabs, D. A., B. K. Martin, et al. (2001). "Longitudinal observations on mutations conferring ganciclovir resistance in patients with acquired immunodeficiency syndrome and cytomegalovirus retinitis : The cytomegalovirus and viral resistance study group report number 8." Am. J. Ophthalm. **132** : 700-710.

Jabs, D. A., B. K. Martin, et al. (2001). "Mutations conferring ganciclovir resistance in a cohort of patients with acquired immunodeficiency syndrome and cytomegalovirus retinitis." J. Infect. Dis. **183** : 333-337.

Jacobson, M. A. (1997). "Treatment of cytomegalovirus retinitis in patients with the acquired immunodeficiency syndrome." N. Engl. J. Med. **337** : 105-114.

Jesionek, A. and B. Kielemenoglou (1904). "Über einen befund von protozoenartigen gebilden in den organen eines heriditarluetischen fotus." Munch. Med. Wochenschr. **51** : 1905-1907.

Joyce, C. and T. A. Steitz (1987). "DNA polymerase: from crystal structure to function via genetics." Trends Biochem. Sc **12** : 288-291.

Joyce, C. and T. A. Steitz (1995). "Polymerase structure and function : variations on a theme." J Bacteriol. **177** : 6321-6329.

K

- Kamps, M. P. and B. M. Sefton (1986). "Neither arginine nor histidine can carry out the function of lysine-295 in the ATP-binding site of p60^{src}." Mol. Cell. Biol. **6** : 751-757.
- Karavellas, M. P., D. J. Plummer, et al. (1999). "Incidence of immune recovery vitritis in cytomegalovirus retinitis patients following institution of successful highly antiretroviral therapy." J. Infect. Dis. **179** : 697-700.
- Kelman, Z., J. Hurwitz, et al. (1998). "Processivity of DNA polymerases: two mechanisms, one goal." Structure **248** : 382-33.
- Kemper, B. and M. Garabett (1981). "Studies on T4-head maturation. 1. Purification and characterization of gene-49-controlled endonuclease." Eur. J. Biochem. **115** : 123-131.
- Kemper, B. and E. Janz (1976). "Function of gene 49 of bacteriophage T4. I. Isolation and biochemical characterization of very fast-sedimenting DNA." J. Virol. **18** : 992-999.
- Kern, E. R., C. B. Hartline, et al. (2004). "Activities of benzimidazole D- and L-ribonucleotides in animal models of cytomegalovirus infections." Antimicrob. Agents chemother. **48** : 1749-1755.
- Komazin, G., R. G. Ptak, et al. (2003). "Resistance of human cytomegalovirus to the benzimidazole L-ribonucleoside maribavir maps to UL27." J. Virol. **77** : 11499-11506.
- Komazin, G., L. B. Townsend, et al. (2004). "Role of a mutation in human cytomegalovirus gene *UL104* in resistance to benzimidazole D-ribonucleosides." J. Virol. **78** : 710-715.
- Kondo, K., H. Kaneshima, et al. (1994). "Human cytomegalovirus latent infection of granulocyte-macrophage progenitors." Proc. Natl. Acad. Sci. USA **91** : 18879-18883.
- Koszalka, G. W., N. W. Johnson, et al. (2002). "Preclinical and toxicology studies of 1263W94, a potent and selective inhibitor of human cytomegalovirus replication." Antimicrob. Agents Chemother. **46** : 2373-2380.
- Kouzarides, T., A. T. Bankier, et al. (1986). "Sequence and transcription analysis of the human cytomegalovirus DNA polymerase gene." J. Virol. **61** : 125-133.
- Krosky, P. M., M. C. Back, et al. (2003). "The human cytomegalovirus UL97 protein kinase, an antiviral drug target, is required at the stage of nuclear egress." J. Virol. **77** : 905-914.
- Krosky, P. M., K. Z. Borysko, et al. (2002). "Phosphorylation of Beta-D-ribozyl benzimidazoles is not required for activity against human cytomegalovirus." Antimicrob. Agents Chemother. **46** : 478-486.
- Krosky, P. M., M. L. Underwood, et al. (1998). "Resistance of human cytomegalovirus to benzimidazole ribonucleosides maps to two open reading frames: UL89 and UL56." J. Virol. **72** : 4721-4728.

Kruger, R. M., W. D. Shannon, et al. (1999). "The impact of ganciclovir-resistant cytomegalovirus infection after lung transplantation." Transplantation **68** : 1272-1279.

Kumar, M. L., G. A. Nankervis, et al. (1973). "Inapparent congenital cytomegalovirus infection: a follow-up study." N. Engl. J. Med. **288** : 1370-1372.

L

Lalezari, J. P., J. A. Aberg, et al. (2002). "Phase I dose escalation trial evaluating the pharmacokinetics, anti-human cytomegalovirus (HCMV) activity, and safety of 1263W94 in human immunodeficiency virus-infected men with asymptomatic HCMV shedding." Antimicrob. Agents Chemother. **46** : 2969-2976.

Landry, M. L., S. Stanat, et al. (2000). "A standardized plaque reduction assay for determination of drug susceptibilities of cytomegalovirus clinical isolates." Antimicrob. Agents Chemother. **44** : 688-692.

Larder, B. A., S. D. Kemp, et al. (1987). "Related functional domains in virus DNA polymerases." EMBO J. **6** : 169-175.

Le Roy, E., A. Muhlethaler-Mottet, et al. (1999). "Escape of human cytomegalovirus from HLA-DR-restricted CD4+ T-cell response is mediated by repression of gamma-interferon-induced class II transactivator expression." J. Virol. **73** : 6582-6581.

Lea, A. P. and H. M. Bryson (1996). "Cidofovir." Drugs **52** : 225-230.

Lee, G. C., D. G. Lee, et al. (2005). "Use of time-saving flow cytometry for rapid determination of resistance of human cytomegalovirus to ganciclovir." J. Clin. Microbiol. **43**(10): 5003-5008.

Legendre, C. M. (2002). "Traitement de l'infection à CMV chez le receveur de greffe d'organe." Cytomégalovirus - Marie.Christine Mazon - Elsevier Guides Médi BIO : 185-191.

Limaye, A. P., P. L. Corey, et al. (2000). "Emergence of ganciclovir-resistant cytomegalovirus disease among recipients of solid-organ transplant." Lancet **356** : 645-649.

Limaye, A. P., G. Raghu, et al. (2002). "High incidence of ganciclovir-resistant cytomegalovirus infection among lung transplant recipients receiving preemptive therapy." J. Infect. Dis. **185** : 20-27.

Littler, E., A. D. Stuart, et al. (1992). "Human cytomegalovirus UL97 open reading frame encodes a protein that phosphorylates the antiviral nucleoside analogue ganciclovir." Nature **358** : 160-162.

Littler, E., J. Zeuthen, et al. (1986). "Identification of Epstein-Barr virus-coded thymidine kinase." EMBO J. **5** : 1959-1966.

- Lowance, D., H. H. Neumayer, et al. (1999). "Valaciclovir for the prevention of cytomegalovirus disease after renal transplantation." N. Engl. J. Med. **340** : 1462-1470.
- Lu, M. and T. Shenk (1996). "Human cytomegalovirus infection inhibits cell cycle progression at multiple points, including the transition from G₁ to S." J. Virol. **70** : 8850-8857.
- Lurain, N., E. A. Thompson, et al. (1992). "Point mutations in the DNA polymerase gene of the cytomegalovirus that result in resistance to antiviral agents." J. Virol. **66** : 7146-7152.
- Lurain, N. S., S. M. Bhorade, et al. (2002). "Analysis and characterization of antiviral drug-resistant cytomegalovirus isolates from solid organ transplant recipients." J. Infect. Dis. **186** : 760-768.
- Lurain, N. S., A. Weinberg, et al. (2001). "Sequencing of cytomegalovirus UL97 gene for genotypic antiviral resistance testing." Antimicrob. Agents Chemother. **45** : 2775-2780.

M

- Machado, C. M., F. L. Dulley, et al. (2000). "CMV pneumonia in allogenic BMT recipients undergoing early threatment of pre-emptive ganciclovir therapy." Bone Marrow Transplan. **26** : 413-417.
- Marchler-Bauer, A. and S. H. Bryant (2004). "CD-Search: protein domain annotations on the fly." Nucleic Acids Res. **32** : W327-331.
- Marschall, M., M. Freitag, et al. (2003). "The proteine kinase pUL97 of human cytomegalovirus interacts with and phosphorylates the DNA polymerase processivity factor pUL44." Virology **311** : 60-71.
- Marschall, M., A. Marzi, et al. (2005). "Cellular p32 recruits cytomegalovirus kinase pUL97 to redistribute the nuclear lamina." J. Biol. Chem. **39** : 33357-33367.
- Marshall, G. S., G. P. Rabalais, et al. (1993). "Cytomegalovirus seroprevalence in women bearing children in Jefferson conty." Am. J. Med. Sci. **305** : 292-296.
- Maslo, C., M. N. Peraldi, et al. (1997). "Thrombotic microangiopathy and cytomegalovirus disease in patients infected with human immunodeficiency virus." Clin. Infect. Dis. **24** : 350-355.
- Matthews, J. T. and R. Boehme (1988). "Antiviral activity and mechanism of action of ganciclovir." Rev. Infect. Dis. **10**(Suppl 3) : S490-494.
- Mazon, M. C. (1997). "Resistance du cytomégalo virus humain aux antiviraux." Virologie **1** : 95-102.
- Mazon, M. C. and S. Alain (1999). "Diagnostic." Elsevier Les herpès virus humains (1ère édition) : 263-283.

- Mazeron, M. C., S. Alain, et al. (1994). "A point mutation in the human cytomegalovirus UL97 gene is associated with reduced sensitivity to ganciclovir." Med. Mal. Infect. **24**(RICA1) : 728-730.
- Mc Knight, S. L. (1980). "The nucleotide sequence and transcript map of the herpes simplex virus thymidine kinase gene." Nucleic Acids Res. **8** : 5949-5963.
- McCutchan, J. A. (1995). "Cytomegalovirus infection of the nervous system in patients with AIDS." Clin. Infect. Dis. **20** : 747-754.
- McVoy, M. A. and S. P. Adler (1994). "Human cytomegalovirus DNA replicates after early circularization by concatemer formation, and inversion occurs within the concatemer." J. Virol. **68** : 1040-1051.
- McVoy, M. A. and D. E. Nixon (2005). "Impact of 2-bromo-5,6-dichloro-1-beta-D-ribofuranosyl benzimidazole ribonucleoside and inhibitors of DNA, RNA, and protein synthesis on human cytomegalovirus maturation." J. Virol. **79** : 11115-11127.
- McVoy, M. A., D. E. Nixon, et al. (1998). "Sequences within the herpesvirus-conserved *pac1* and *pac2* motifs are required for cleavage and packaging of the murine cytomegalovirus genome." J. Virol. **72** : 48-56.
- McVoy, M. A. and D. Ramnarain (2000). "Machinery to support genome segment inversion exists in a herpesvirus which does not naturally contain invertible elements." J. Virol. **74** : 4882-4887.
- Metselaar, H. J. and W. Weinar (1989). "Cytomegalovirus infection and renal transplantation." J. Antimicrob. Chemother. **23** : 37-47.
- Mettenleiter, T. C. (2002). "Herpesvirus assembly and egress." J. Virol. **76**(4) : 1537-1547.
- Metzger, C., D. Michel, et al. (1994). "Human cytomegalovirus UL97 kinase confers ganciclovir susceptibility to recombinant vaccinia virus." J. Virol. **68** : 8423-8427.
- Meyerson, D., R. C. Hackman, et al. (1984). "Widespread presence of histologically occult cytomegalovirus." Hum.Pathol. **15** : 430-439.
- Meyohas, M. C. (1999). "Cytomégalovirus : expression clinique chez l'immunocompétent." "Clinique chez l'immunodéprimé" Elsevier, **Paris** : 173-208.
- Michel, D., S. Kramer, et al. (1999). "Amino acids of conserved kinase motifs of cytomegalovirus protein UL97 are essential for autophosphorylation." J. Virol. **73**(10) : 8898-8901.
- Michel, D., I. Pavic, et al. (1996). "The UL97 gene product of the human cytomegalovirus is an early-late protein with a nuclear localization but is not a nucleoside kinase." J. Virol. **70** : 6340-6347.

- Michel, D., P. Schaarschmidt, et al. (1998). "Functional regions of the human cytomegalovirus protein pUL97 involved in nuclear localization and phosphorylation of ganciclovir and pUL97 itself." J. Gen. Virol. **79** : 2105-2112.
- Milpied, N. (2002). "Traitement de la maladie à cytomégalo­virus et greffe de moelle." Cytomégalo­virus - Marie.Christine Mazon - Elsevier Guides Médi BIO : 169-183.
- Mitchell, M. S., S. Matsuzaki, et al. (2002). "Sequence analysis of bacteriophage T4DNA packaging/terminase genes 16 and 17 reveals a common ATBase center in the large subunit of viral terminases." Nucleic Acids Res. **30** : 4009-4021.
- Mocarski, E. S. (2002). "Immunomodulation by cytomegalovirus manipulative strategies beyond evasion." Trends Microbiol. **10** : 332-339.
- Mocarski, E. S. and C. Tan Courcelle (2004). "Cytomegalovirus and their replication." Fields BN, Knipe DM eds. Virology : Raven Press, New York **2** : 2629-2673.
- Montague, M. G. and C. A. Hutchinson (2000). "Gene content phylogeny of herpesviruses." Proc. Natl. Acad. Sci. USA **97** : 5334-5339.
- Murphy, E., D. Yu, et al. (2003). "Coding potential of laboratory and clinical strains of human cytomegalovirus." **100** : 14976-14981.
- Myerson, D., R. C. Hackman, et al. (1984). "Widespread presence of histologically occult cytomegalovirus." Human Pathology **14** : 430-439.

N-O

- Naesen, L. and E. De Clercq (2001). "Recent developments in herpesvirus therapy." Herpes **8** : 12-16.
- Neff, B. J., R. E. Weibel, et al. (1979). "Clinical and laboratory study of live cytomegalovirus vaccine Ad-169." Proc. Soc. Exp. Biol. Med. **160** : 32-37.
- Newcomb, W. W., F. L. Homa, et al. (2005). "Involvement of the portal at an early step in herpes simplex virus capsid assembly." J. Virol. **79** : 10540-10546.
- Newcomb, W. W., R. M. Juhas, et al. (2001). "The UL6 gene product forms the portal for the entry of DNA into the herpes simplex virus capsid." J. Virol. **75** : 10923-10932.
- Nico, M. M., N. C. Cymbalista, et al. (2000). "Perianal cytomegalovirus ulcer in an HIV infected patient: a report and review of literature." J. Dermatol. **27** : 99-105.
- Nixon, D. E. and M. A. McVoy (2004). "Dramatic effects of 2-bromo-5,6-dichloro-1-beta-D-ribofuranosyl benzimidazole ribonucleoside on the genome structure, packaging, and egress of guinea pig cytomegalovirus." J. Virol. **78** : 1623-1635.

Nordoy, I., F. Muller, et al. (2000). "The role of the tumor necrosis factor and interleukin-10 during cytomegalovirus infection in renal transplant recipient." J. Infect. Dis. **181** : (51-61).

Oberg, B. (1983). "Antiviral effects of phosphonoformate (PFA, foscarnet sodium)." Pharmacol. Ther. **19** : 387-415.

P

Pallela, F. J., K. M. Delaney, et al. (1998). "Declining morbidity and mortality among patients with advanced human immunodeficiency virus infection." N. Engl. J. Med. **338** : 853-860.

Pass, R. F. (2004). "Cytomegalovirus." Fields BN, Knipe DM eds. Virology : Raven Press, New York **2** : 2675-2705.

Paston, S. J., I. A. Dodi, et al. (2004). "Progress made towards the development of a CMV peptide vaccine." Hum. Immunol. **65** : 544-549.

Pepperl-Klindworth, S., N. Frankenberg, et al. (2003). "Protein delivery by subviral particles of human cytomegalovirus." Gen. Ther. **10** : 278-284.

Pepperl-Klindworth, S., J. Munster, et al. (2000). "Dense bodies of human cytomegalovirus induce both humoral and cellular immune responses in the absence of viral gene expression." J. Virol. **74** : 6132-6146.

Plachter, B., C. Sinzger, et al. (1996). "Cell types involved in replication and distribution of human cytomegalovirus." Adv. Virus Res. **46** : 195-261.

Plotkin, S. A., S. E. Starr, et al. (1989). "Protective effects of Towne cytomegalovirus vaccine against low-passage cytomegalovirus administered a challenge." J. Infect. Dis. **159** : 860-865.

Prichard, M. N., W. J. Britt, et al. (2005). "Human UL97 kinase is required for the normal intracellular distribution of pp65 and virion morphogenesis." J. Virol. **79** : 15494-15502.

Prichard, M. N., G. M. Duke, et al. (1996). "Human cytomegalovirus uracil glycosylase is required for the normal temporal regulation of both synthesis and viral replication." J. Virol. **70** : 3018-3025.

Prichard, M. N., N. Gao, et al. (1999). "A recombinant human cytomegalovirus with a large deletion in UL97 has a severe replication deficiency." J. Virol. **73** : 5663-5670.

Prichard, M. N., D. C. Quenelle, et al. (2006). "Human cytomegalovirus pUL27 is not required for viral replication in human tissue implanted in SCI mice." Virology J. **3**(18) : in press.

Prix, L., K. Hamprecht, et al. (1999). "Comprehensive restriction analysis of the UL97 region allows early detection of ganciclovir resistant human cytomegalovirus in an immunocompromised child." J. Infect. Dis. **180** : 491-495.

Prix, L., J. Maierl, et al. (1998). "A simplified assay for screening of drug resistance of cell-associated cytomegalovirus strains." J. Clin. Virol. **11** : 29-37.

R

Reddhase, M. J. (2000). "The immunogenicity of human and murine cytomegaloviruses." Curr. Opin. Immunol. **12** : 390-396.

Reed, E. C., R. A. Bowden, et al. (1988). "Treatment of cytomegalovirus pneumonia with ganciclovir and intravenous cytomegalovirus immunoglobulin in patients with bone marrow transplants." Ann. Inter. Med. **109** : 783-788.

René, E., C. Marche, et al. (1988). "Cytomegalovirus colitis in patient with acquired immunodeficiency syndrome." Dig. Dis. Sci. **33** : 741-750.

Rentenaar, R. J., L. E. Gamadia, et al. (2000). "Development of virus-specific CD4(+) T cells during primary cytomegalovirus infection." J. Clin. Invest. **105** : 541-547.

Reusser, P. (1996). "Herpesvirus resistance to antiviral drugs: a review of the mechanisms, clinical importance and therapeutic options." J. Hosp. Infect. **33** : 235-248.

Ridge, J. P., F. RDi Rosa, et al. (1998). "A conditioned dendritic cell can be a temporal bridge between a CD4+ T-helper and T-killer cell." Nature **393**: 474-478.

Rowe, W. P., J. W. Hartley, et al. (1956). "Cytopathic agent resembling human salivary gland virus recovered from tissue cultures of human adenoids." Proc. Soc. Exp. Biol. Med. **92** : 418-424.

Rowshani, A. T., F. J. Bemelman, et al. (2005). "Clinical and immunologic aspects of cytomegalovirus infection in solid organ transplant recipients." Transplantation **79** : 381-386.

Rozenberg, F. (1999). "Infection maternofoetale à cytomégalovirus." Cytomégalovirus Elsevier - Guide MédiBIO, Paris : 103-119

Rubin, R. H. (1990). "Impact of cytomegalovirus infection in organ transplant recipients." Rev. Infect. Dis. **12** : S754-766.

S

- Salmon, D., M. C. Mazon, et al. (2000). "Plasma CMV DNA, pp65 antigenemia and a low CD4 count remain risk factors for CMV disease in patients receiving HAART." AIDS **14** : 1041-1049.
- Salvant, B. S., E. A. Fortunato, et al. (1998). "Cell cycle dysregulation by human cytomegalovirus: influence of the cell cycle phase at the time of infection and effects on cyclin transcription." J. Virol. **72** : 3729-3741.
- Sarisky, R. T. and G. S. Hayward (1996). "Evidence that the UL84 gene product of human cytomegalovirus is essential for promoting oriLyt-dependent DNA replication and formation of replication compartments in cotransfection assays " J. Virol. **70** : 7398-7413.
- Savva, C. G. W., A. Holzenburg, et al. (2004). "Insights into the structure of human cytomegalovirus large terminase subunit pUL56." FEBS Letters **563** : 135-140.
- Schleiss, M. R. (2005). "Progress in cytomegalovirus vaccine development." Herpes **12**(3) : 66-75.
- Schleiss, M. R. and T. C. Heineman (2005). "Progress toward an elusive goal: current status of cytomegalovirus vaccines." Expert Rev. Vaccines **4** : 381-406.
- Scholz, B., S. Rechter, et al. (2003). "Identification of the ATP-binding site in the terminase subunit pUL56 of human cytomegalovirus." Nucleic Acids Res. **31**(5) : 1426-1433.
- Schoppel, K., B. Kropff, et al. (1997). "The humoral immune response against human cytomegalovirus is characterized by a delayed synthesis of glycoprotein-specific antibodies." J. Infect. Dis. **175** : 533-544.
- Schrier, R. D., J. A. Nelson, et al. (1985). "Detection of human cytomegalovirus in peripheral blood lymphocytes in a natural infection." Science **230** : 1048-1051.
- Segondy, M. (2002). "Réponse immunitaire au cours de l'infection à cytomégalo virus." Cytomégalo virus - Marie.Christine Mazon - Elsevier- Guides Médi BIO, Paris : 51-67.
- Sester, M., U. Sester, et al. (2002). "Sustained high frequencies of specific CD4 T cells restricted to a single persistent virus." J. Virol. **76** : 3748-3753.
- Sinzger, C. and G. Jahn (1996). "Human cytomegalovirus cell tropism and pathogenesis." Intervirology **39**: 302-319.
- Sinzger, C., B. Plachter, et al. (1996). "Tissue macrophages are infected by human cytomegalovirus *in vivo*." J. Infect. Dis. **173** : 240-245.
- Smith, I. L., J. M. Cherrington, et al. (1997). "High-level resistance of cytomegalovirus to ganciclovir is associated with alterations in both the UL97 and DNA polymerase genes." J. Infect. Dis. **176** : 69-77.

- Smith, M. G. (1956). "Propagation in tissue culture of cytopathogenic virus human salivary gland virus disease." Proc. Soc. Exp. Biol. Med. **92** : 424-430.
- Smith, R. F. and T. F. Smith (1989). "Identification of new protein kinase related genes in three herpesviruses: herpes simplex virus, varicella zoster virus, and Epstein-Barr virus." J. Virol. **63** : 450-455.
- Smuda, C., E. Bogner, et al. (1997). "The human cytomegalovirus glycoprotein B gene (ORF UL55) is expressed early in the infection cycle." J. Gen. Virol. **78** : 1881-1992.
- Snoeck, R., J. Andrei, et al. (1996). "Patterns of resistance and sensitivity to antiviral compounds of drug-resistant strains of human cytomegalovirus selected *in vitro*." Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis. **15** : 574-579.
- Snydman, D. R., B. G. Werner, et al. (1987). "Use of cytomegalovirus globulin to prevent cytomegalovirus disease in renal-transplant recipients." N. Engl. J. Med. **317** : 1049-1054.
- Sodeberg-Naucler, C., K. N. Fish, et al. (1997). "Reactivation of latent cytomegalovirus by allogenic stimulation of blood cells from healthy donors." Cell **91** : 119-126.
- Sodeberg-Naucler, C. and J. A. Nelson (1999). "Human cytomegalovirus latency and reactivation-a delicate balance between the virus and its host's immune system." Intervirology **42** : 314-321.
- Spaete, R. R. (1991). "A recombinant subunit vaccine approach to HCMV vaccine development." Transplant. Proc. **23** : 90-96.
- Speich, R. and B. W. Van Der (2001). "Epidemiology and management of infections after lung transplantation." Clin. Infect. Dis. **33** : S58-S65.
- Stagno, S., R. F. Pass, et al. (1986). "Primary cytomegalovirus infection in pregnancy: incidence, transmission to fetus, and clinical outcome." JAMA **256** : 1904-1908.
- Stanat, S. C., J. E. Reardon, et al. (1991). "Ganciclovir-resistant cytomegalovirus clinical isolates: mode of resistance to ganciclovir." Antimicrob. Agents Chemother. **35** : 2191-2197.
- Steitz, T. A. (1999). "DNA polymerase: structural diversity and common mechanisms." J. Biol. Chem. **274** : 17395-17398.
- Stern, H. (1984). "Live cytomegalovirus vaccination of healthy volunteers: eight-year follow-up studies." Birth defects. Orig. Artic. Ser. **20** : 263-269.
- Sternberg, J. E. and W. R. Taylor (1984). "Modelling the ATP-binding site of oncogene products, the epidermal growth factor receptor and related proteins." FEBS Lett. **175** : 387-391.
- Stinski, M. F. (1990). "Cytomegalovirus and its replication." Raven Press , New York **69** : 1959-1980.

Stewart, J. A., S. E. Reef, et al. (1995). "Herpesvirus infections in persons infected with human immunodeficiency virus." J. Clin. Invest. Dis. **21** : 114-120.

Sullivan, V., K. K. Biron, et al. (1992). "A point mutation in the human cytomegalovirus DNA polymerase gene confers resistance to ganciclovir and phosphonylmethoxyalkyl derivatives." Antimicrob. Agents Chemother. **37** : 19-25.

Sullivan, V., C. L. Talarico, et al. (1992). "A protein kinase homologue controls phosphorylation of ganciclovir in human cytomegalovirus-infected cells." Nature **358** : 162-164.

Sylwester, A. W., B. L. Mitchell, et al. (2005). "Broadly targeted human cytomegalovirus-specific CD4+ and CD8+ T cells dominate the memory compartments of exposed subjects" J. Exp. Med. **202** : 673-685.

T-U

Taylor-Weideman, J., J. G. Sissons, et al. (1991). "Monocytes are a major site of persistence of human cytomegalovirus in peripheral blood mononuclear cells." J. Gen. Virol. **72** : 2059-2064.

Tchesnokov, E., C. Gilbert, et al. (2006). "Role of Helix P of the human cytomegalovirus DNA polymerase in resistance hypersusceptibility to the antiviral drug foscarnet." J. Virol. **80** : 1440-1450.

Temperton, N. J. (2002). "DNA vaccines against cytomegalovirus: current progress." Int. J. Antimicrob. Agents **19** : 169-172.

Thompson, J. D., D. G. Higgins, et al. (1994). "CLUSTALW: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, positions-specific gap penalties and weight matrix choice." Nucleic Acids Res. **22** : 4673-4680.

Toorkey, C. B. and D. R. Carrigan (1989). "Immunohistochemical detection of an immediate early antigen of human cytomegalovirus in normal tissues." J. Infect. Dis. **160** : 741-751.

Townsend, L. B., R. Devivar, et al. (1995). "Design, synthesis, and antiviral activity of certain 2,5,6-trihalo-1-(beta-D-ribofuranosyl)benzimidazoles." J. Med. Chem **38** : 4098-4105.

Underwood, M. L., R. J. Harvey, et al. (1998). "Inhibition of human cytomegalovirus DNA maturation by a benzimidazole ribonucleoside is mediated through the UL89 gene product." J. Virol. **72** : 717-725.

Underwood, M. L., R. J. Harvey, et al. (1999). "Inhibition of human DNA maturation by a benzimidazole ribonucleoside is mediated through the UL89 gene product." J. Virol. **72** : 717-725.

V-W

- Van Lier, R. A., I. J. Ten Berge, et al. (2003). "Human CD8(+) T-cell differentiation in response to virus." Nat. Rev. Immunol. **3** : 391-399.
- Vitragen Study group (2002). "A randomized controlled clinical trial of intravenous formivirsen for treatment of newly diagnosed peripheral retinitis in patients with AIDS." Am. J. Ophthalmol. **133** : 16-174.
- Voet, D. and J. G. Voet (2004). "Biochimie." Biochimie, 2ème Edition, Traduction G. Rousseau et L. Domenjoud Edition de boeck, Paris : 1163-1168.
- Walker, J., M. Saraste, et al. (1982). "Distantly related sequences in the a- and b-subunits of ATP synthase, myosin, kinases and other ATP-requiring enzymes and a common nucleotide binding fold." EMBO J. **1** : 945-951.
- Walker, R. C., W. F. Marshall, et al. (1995). "Pretransplantation assessment of the risk of lymphoproliferative disorder." Clin. Infect. Dis. **20** : 1346-1353.
- Wang, Z., L. R. C., et al. (2004). "Attenuated poxviruses generate clinically relevant frequencies of CMV-specific T cells." Blood **104** : 847-856.
- Wang, Z., C. La Rosa, et al. (2004). "Recombinant modified vaccinia virus Ankara expressing a soluble form of glycoprotein B causes durable immunity and neutralizing antibodies against multiple strains of human cytomegalovirus." J. Virol. **78** : 3965-3976.
- Weinberg, A., D. A. Jabs, et al. (2003). "Mutations conferring foscarnet resistance in a cohort of patients with acquired immunodeficiency syndrome and cytomegalovirus retinitis." J. Infect. Dis. **187**: 777-884.
- Weller, T. H., J. B. Hanshaw, et al. (1960). "Serologic differentiation of viruses responsible for cytomegalic inclusion disease." Virology **12** : 130-132.
- Wiertz, E. J., T. R. Jones, et al. (1996). "The human cytomegalovirus US11 gene product dislocates MHC class I heavy chains from the endoplasmic reticulum to the cytosol." Cell **84** : 84-90.
- Wiesner, R. H., E. Marin, et al. (1993). "Advances in the diagnosis, treatment, and prevention of cytomegalovirus infections after liver transplantation." Gastroenterol. Clin. North. Am. **22** : 351-366.
- Williams, S., C. B. Hartline, et al. (2003). "In vitro activities of benzimidazole D- and L-ribonucleosides against herpesviruses." Antimicrob. Agents Chemother. **47** : 2186-2192.

Wing, B. A. and E. S. Huang (1995). "Analysis and mapping of a family of 3'-coterminal transcripts containing coding sequences for human cytomegalovirus open reading frames UL93 through UL99." J. Virol. **69** : 1521-1531.

Winters, H. V., M. K. Kwok, et al. (1989). "Cytomegalovirus in the nervous system of patients with the acquired immune deficiency syndrome." Brain **112** : 245-268.

Wolf, D. G., A. A. Smith, et al. (1995). "Mutations in human cytomegalovirus UL97 gene confer clinical resistance to ganciclovir and can be detected directly in patient plasma." J. Clin. Invest. **95** : 257-263.

Wolf, D. G., C. T. Courcelle, et al. (2001). "Distinct and separate roles for herpesvirus-conserved UL97 kinase in cytomegalovirus DNA synthesis and encapsidation." PNAS **98**(4) : 1895-1900.

X-Y-Z

Xiong, X., J. L. Smith, et al. (1997). "Effect of incorporation of cidofovir into DNA by human cytomegalovirus DNA polymerase on DNA elongation." Antimicrob. Agents Chemother. **41** : 594-599.

Xiong, X., J. L. Smith, et al. (1996). "Kinetic analysis of the interaction of cidofovir diphosphate with human cytomegalovirus DNA polymerase." Biochem Pharmacol **51** : 1563-1567.

Ye, L. B. and E. S. Huang (1993). "*In vitro* expression of the human cytomegalovirus DNA polymerase gene: effects of sequence alterations on enzyme activity." J. Virol. **67** : 6339-6347.

Zaia, J. A., G. Gallez-Hawkins, et al. (2001). "Infrequent occurrence of natural mutations in the pp65(495- 503) epitope sequence presented by the HLA A*0201 allele among human cytomegalovirus isolates." J. virol. **75** : 2472-2474.

Zhou, L., T. C. Harder, et al. (1999). "Rapid detection by reverse hybridization of mutations in the UL97 gene of human cytomegalovirus conferring resistance to ganciclovir." J. Clin. Virol. **13**(1-2) : 53-59.

Zhou, Y. F., M. B. Leon, et al. (1996). "Association between prior cytomegalovirus infection and the risk of restenosis after coronary atherectomy." N. Engl. J. Med. **335** : 624-630.