

UNIVERSITE DE LIMOGES

ECOLE DOCTORALE Science-Technologie-Santé

Faculté de Médecine

Année 2009

Thèse N°

Thèse

Pour obtenir le grade de

DOCTEUR DE L'UNIVERSITE DE LIMOGES

Discipline : Biologie - Sciences - Santé

Présentée et soutenue par

Sébastien HANTZ

Le 23 octobre 2009

Résistance du cytomégalo virus aux antiviraux :

de la clinique à la structure

Thèse dirigée par le Pr Sophie ALAIN

Jury :

Mr le Pr François DENIS, Président

Mr le Pr Jacques IZOPET, Rapporteur

Mme le Dr Marie-Christine MAZERON, Rapporteur

Mr le Dr Serge BOUAZIZ, Examineur

Mme le Pr Sophie ALAIN, Directeur de thèse

Remerciements

A **Monsieur le Professeur François Denis**, Professeur des Universités de Bactériologie-Virologie-Hygiène, Biologiste des Hôpitaux, de nous faire l'honneur de présider ce jury après nous avoir transmis sa passion de la microbiologie puis de la vaccinologie et permis de réaliser de nombreux travaux au sein de son laboratoire appuyés par des conseils toujours aussi précieux. Qu'il trouve ici l'expression de tout mon respect et mon admiration.

A **Monsieur le Professeur Jacques Izopet**, Professeur des Universités de Bactériologie-Virologie-Hygiène, Biologiste des Hôpitaux, Chef de service, d'avoir accepté de juger ce travail et de nous faire l'honneur de participer au jury de cette thèse. Qu'il trouve ici l'expression de tout mon respect.

A **Madame le Docteur Marie-Christine Mazon**, Maître de Conférences des Universités de Bactériologie-Virologie-Hygiène, Praticien Hospitalier, d'avoir accepté de juger ce travail et de nous faire l'honneur de participer au jury de cette thèse. Qu'elle soit ici vivement remerciée pour ses précieux conseils aux différentes étapes de mon cursus, sa disponibilité et son avis infaillible sur le cytomégalovirus.

A **Monsieur le Docteur Serge Bouaziz**, Chargé de recherche à l'UFR des Sciences Pharmaceutiques et Biologiques de l'Université Paris V, d'avoir accepté de juger ce travail et d'avoir contribué activement à notre étude en répondant toujours présent à la moindre sollicitation.

A **Madame le Professeur Sophie Alain**, Professeur des Universités de Bactériologie-Virologie-Hygiène, Biologiste des Hôpitaux, pour m'avoir encadré depuis le début de mon internat et m'avoir associé aux différents projets du CNR Cytomégalovirus. Qu'elle reçoive toute ma gratitude pour sa patience, sa disponibilité et ses précieux conseils.

A Mademoiselle le Professeur Marie-Cécile Ploy, Professeur des Universités de Bactériologie-Virologie-Hygiène, Directeur de l'Equipe d'Accueil EA3175, Avenir Inserm, de nous avoir permis de réaliser ce travail au sein de l'unité de recherche. Qu'elle soit ici remerciée pour son dynamisme, son soutien permanent et ses encouragements.

A Gaël Champier qui a initié les travaux d'étude structurale des protéines cibles des antiviraux anti-cytomégalo virus, pour son amitié, ses précieux conseils et sa disponibilité.

A Anthony Couvreur pour la partie structurale des différentes études, avec toujours des conseils avisés et une disponibilité sans faille.

Au Dr Jérôme Grosjean, pour son aide quotidienne dans la gestion de la routine du laboratoire, des « tracas » informatiques, et pour son amitié.

A Madame Françoise Garnier, pour son travail titanesque de mise à jour de la base de données du protocole de suivi des transplantés et pour son amitié.

A tous les membres de l'EA 3175 pour leur bonne humeur, leurs conseils et leur aide.

A tout le personnel du laboratoire de Bactériologie-Virologie-Hygiène qui m'a supporté durant la rédaction de cette thèse, pour leur gentillesse et leur investissement dans le diagnostic virologique au service des patients.

A mes parents et beaux-parents
Merci pour votre soutien inconditionnel

A Valérie,
Merci pour ta patience durant ces longues soirées de travail

A Julie et Emma, mes trésors,

Liste des abréviations

| 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 |
| BAC | <i>Bacterial Artificial Chromosome</i> |
| C | Cytidine/Cytosine |
| CDV | Cidofovir |
| CI50 | Concentration Inhibitrice 50 % |
| Cmax | Concentration maximale plasmatique |
| CMV | Cytomégalovirus |
| CMVH | Cytomégalovirus humain |
| D | Donneur |
| DO | Densité Optique |
| E | <i>Early</i> |
| EBV | Epstein Barr Virus |
| ECP | Effet Cytopathique |
| ELISA | <i>Enzyme Linked Immuno Sorbent Assay</i> |
| g | Grammes |
| G | Guanine |
| gB | Glycoprotéine B |
| gH | Glycoprotéine H |
| gM | Glycoprotéine M |
| gN | Glycoprotéine N |
| GCV | Ganciclovir |
| GST | Glutathion-S-Transférase |
| G+C % | Pourcentage de bases guanine et cytidine |
| HHV | <i>Human herpes virus</i> |

| | |
|----------------|---|
| HSV | <i>Herpes simplex virus</i> |
| IE | <i>Immediate early</i> |
| IPTG | Isopropyl-thio- β -D-galactoside |
| Ig | Immunoglobuline |
| IgG | Immunoglobuline G |
| IgM | Immunoglobuline M |
| IS50 | Indice de sensibilité à 50% |
| Kb | Kilobase |
| KDa | KiloDalton |
| Kpb | Kilopaire de Bases |
| L | <i>Late</i> |
| LBA | Liquide broncho alvéolaire |
| LCR | Liquide céphalorachidien |
| LIR/IRL | <i>Long Internal Repeat</i> |
| LTR/TRL | <i>Long Terminal Repeat</i> |
| M | Molaire (mole par litre) |
| MBV | Maribavir |
| MIC | Maladie des inclusions cytomégaliqes |
| mL | Millilitre |
| ng | Nanogramme |
| nm | Nanomètre |
| pac | <i>Cis-acting packaging element</i> |
| pb | paires de bases |
| PBS | <i>Phosphate Buffer Saline</i> (tampon phosphate) |
| PCR | <i>Polymerase Chain Reaction</i> |
| PFA | Foscarnet |
| pM | Picomolaire |
| Pol | Polymérase |
| R | Receceur |
| SDS | Sodium-dodecyl-sulfate |
| SIR/IRS | <i>Short Internal Repeat</i> |
| SIDA | Syndrome d'immunodéficience acquise |
| T | Thymidine |

| | |
|-------------|-------------------------------------|
| UL | Segment unique long (unique long) |
| US | Segment unique short (unique court) |
| VCV | Valaciclovir |
| VGCV | Valganciclovir |
| VIH | Virus de l'immunodéficience humaine |
| VZV | Virus de la varicelle et du zona |
| µg | Microgramme |
| µl | Microlitre |
| µM | Micromolaire |

Liste des tableaux

Tableau 1: Manifestations cliniques les plus fréquentes de l'infection à CMVH chez les patients immunodéprimés

Tableau 2: Exemples de techniques commercialisées et de techniques artisanales illustrant la diversité des méthodes utilisées pour quantifier la charge virale circulante.

Tableau 3: Stratégies thérapeutiques pour la prise en charge des patients transplantés

Tableau 4: Récapitulatif des différentes mutations de pUL97 conférant une augmentation de la CI50 après transfert à une souche sauvage

Tableau 5: Mutations de résistance de pUL97 au MBV conférant une augmentation de la CI50 après transfert à une souche sauvage

Tableau 6: Mutations de l'ADN polymérase pUL54 du CMVH impliquées dans la résistance aux antiviraux. D'après (Ducancelle *et al.*, 2006b).

Tableau 7: Liste des différents fragments peptidiques de pUL56 et pUL89 clonés dans le vecteur pGEX-6P-1 pour la production.

Tableau 8: Tableau récapitulatif des résultats de l'analyse en spectrométrie de masse de la production de pUL56.

Tableau 9: Récapitulatif du nombre d'amines libres, des epsilons ainsi que des concentrations de chaque molécules déterminés après mesure de la DO à 280nm pour l'expérience de *cross-linking*.

Tableau 10: Composition des différents mélanges réactionnels de l'expérience de *cross-linking*.

Liste des figures

Figure 1 : Classification des herpèsvirus

Figure 2 : Structure de particule virale du CMVH

Figure 3 : Description du génome du CMVH.

Figure 4 : Mécanisme d'entrée du virus au niveau de la membrane cellulaire

Figure 5 : Réplication et encapsidation de l'ADN viral

Figure 6 : Physiopathologie de l'infection à CMVH

Figure 7 : Dissémination sanguine du CMVH.

Figure 8 : Transmission materno-fœtale du cytomégalovirus.

Figure 9: Aspect caractéristique en œil de hibou d'une cellule infectée par le CMVH (épithélium respiratoire).

Figure 10: Isolement du CMVH en culture virale

Figure 11: Détection du cytomégalovirus par culture rapide

Figure 12: Antigénémie pp65

Figure 13 : Mode d'action des inhibiteurs de l'ADN polymérase virale UL54.

Figure 14 : Cycle viral et site d'action des antiviraux.

Figure 15: Effet cytopathique de CMVH caractéristique de l'inhibition de pUL97 par le MBV

Figure 16: Prédiction de la structure du site catalytique de pUL97 par comparaison avec la famille des S-Tkc kinases à l'aide du logiciel Cn3D (*Conserved Domains search*, NCBI).

Figure 17: Principaux domaines et régions fonctionnelles de pUL97 avec la localisation des principales mutations responsables de résistance au ganciclovir et au maribavir.

Figure 18 : Fonctions de la protéine kinase pUL97 au cours de la réplication virale.

Figure 19: Structure modélisée du site de fixation de l'ATP (A) et du maribavir (B) de la protéine kinase pUL97 du CMVH, déduite d'une homologie de structure avec la protéine kinase de la levure GCN2

Figure 20: Domaines d'homologies de l'ADN polymérase pUL54 du CMVH (D'après (Ducancelle *et al.*, 2006b)

Figure 21: Aspect au microscope électronique et structure tridimensionnelle théorique du dimère de pUL56s

Figure 22: Observation au microscope électronique des oligomères formés par la protéine pUL104 du cytomégalovirus et proposition d'un modèle

Figure 23 : Prédiction de structure tri-dimensionnelle des domaines fonctionnels de deux herpèsvirus (CMVH et RCMV) par homologie avec la structure de la cdk2.

Figure 24 : Régions conservés de pUL56 et courbe d'hydrophobicité de pUL56 déterminée selon la méthode d'Eisenberg

Figure 25 : Carte du vecteur de production pGEX-6P-1 (Amersham).

Figure 26 : Effet du sarkosyl sur la solubilité de la protéine UL56

Figure 27: Etapes de la purification analysées sur gel de polyacrylamide 12% avec révélation au bleu de Coomassie et l'analyse des protéines produites par western blot

Figure 28: Excision de la GST par clivage enzymatique avec la PreScission Protease™ (Amersham).

Figure 29 : Expérience de retard sur gel entre pUL89(580-600) et les peptides A, C, et F après *cross-linking* par le BS3

Table des matières

| | |
|--|------------|
| Introduction..... | 12 |
| Analyse bibliographique..... | 14 |
| Objectifs..... | 102 |
| Résultats..... | 105 |
| Discussion et perspectives..... | 241 |
| Conclusion..... | 249 |
| Bibliographie..... | 251 |
| Annexe..... | 274 |

Introduction

Le cytomégalo­virus humain, CMVH, est un virus ubiquitaire avec une répartition mondiale. Les infections sont souvent inapparentes chez l'immunocompétent 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. La prise en charge thérapeutique de l'infection à CMVH reste souvent difficile avec des traitements peu nombreux présentant des effets indésirables notoires à type de toxicité hématologique ou rénale. Les traitements actuels sont trois inhibiteurs de l'ADN polymérase virale pUL54 : le ganciclovir, qui nécessite une activation par la kinase virale pUL97, le cidofovir et le foscarnet, auxquels il faut ajouter deux prodrogues, le valganciclovir et le valaciclovir, ce dernier étant réservé à la prophylaxie. Ces traitements étant administrés en cures prolongées, souvent à posologie réduite, tant que l'immunodépression persiste, des souches virales de CMVH progressivement résistantes à ces molécules émergent du fait de l'apparition de mutations au sein des gènes *UL97* et *UL54*.

Afin de pallier aux problèmes de toxicité induite par ces molécules et d'émergence de souches résistantes, de nouveaux antiviraux sont en développement. Les dérivés benzimidazolés D-ribonucléosides 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.

Dans un premier temps, nous avons surveillé l'émergence de la résistance du cytomégalo­virus aux antiviraux dans une cohorte de patients transplantés. La découverte de nouvelles mutations parallèlement au lancement du MBV nous ont fait nous intéresser aux relations structure-fonction de pUL97 et de son cofacteur potentiel pUL27. Dans un deuxième temps, nous avons poursuivi l'étude des protéines cibles des dérivés benzimidazolés D-ribonucléosides afin de mieux comprendre le mécanisme d'encapsidation de l'ADN viral.

Analyse bibliographique

1. Le cytomégalovirus humain

1.1. Généralités

1.1.1. 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. Ils appelèrent cette maladie, la maladie des inclusions cytomégaliqes (MIC). Constatant la similitude de ces cellules avec la lésion herpétique, Lipschutz évoqua le premier l'origine virale de la MIC en 1921, hypothèse confirmée par les travaux de Goodpasture et Talbot (Goodpasture *et al.*, 1921). Dans les années 1956/1957, l'origine virale de la MIC a été vérifiée de façon indépendante par les équipes de Smith, Rowe et Weller respectivement par isolement à partir de prélèvements de rein et glandes salivaires (Smith, 1956), de tissu adénoïdien d'où a été isolée la souche AD169 (Rowe *et al.*, 1956) et de foie et d'urines (Weller *et al.*, 1960). Ils observèrent une répllication dans des fibroblastes humains en culture caractérisée par l'apparition de corps d'inclusion intranucléaires. Ces observations *in vitro* d'apparence similaire aux inclusions décrites dans la MIC conduisirent Weller à proposer le nom de cytomégalovirus pour l'agent responsable en 1960 (Weller *et al.*, 1960). L'isolement du virus, son étude structurale en microscopie électronique et sa large diffusion dans la population ont permis de montrer qu'il était lié à la famille des *Herpesviridae*.

1.1.2. Classification

Les Herpesviridae partagent essentiellement quatre propriétés biologiques importantes :

1. Une quantité importante d'enzymes est impliquée dans le métabolisme des acides nucléiques (thymidine kinase, thymidilate synthétase, dUTPase, ribonucléotide réductase), dans la synthèse d'ADN (ADN polymérase, hélicase, primase) et dans la synthèse des protéines (protéines kinases).
2. La synthèse d'ADN viral et l'assemblage de la capsid se déroulent dans le noyau, alors que l'assemblage final du virion est réalisé dans le cytoplasme

3. La production de particules infectieuses s'accompagne d'une destruction des cellules infectées.
4. La latence : après résolution de l'infection aiguë, le génome est retrouvé sous forme circulaire épisomale dans le noyau de certaines cellules où seuls quelques gènes sont exprimés. A l'état de latence, aucune particule infectieuse n'est produite ce qui différencie cet état d'une infection chronique. Le virus possède la capacité de reprendre sa réplication virale entraînant une nouvelle infection.

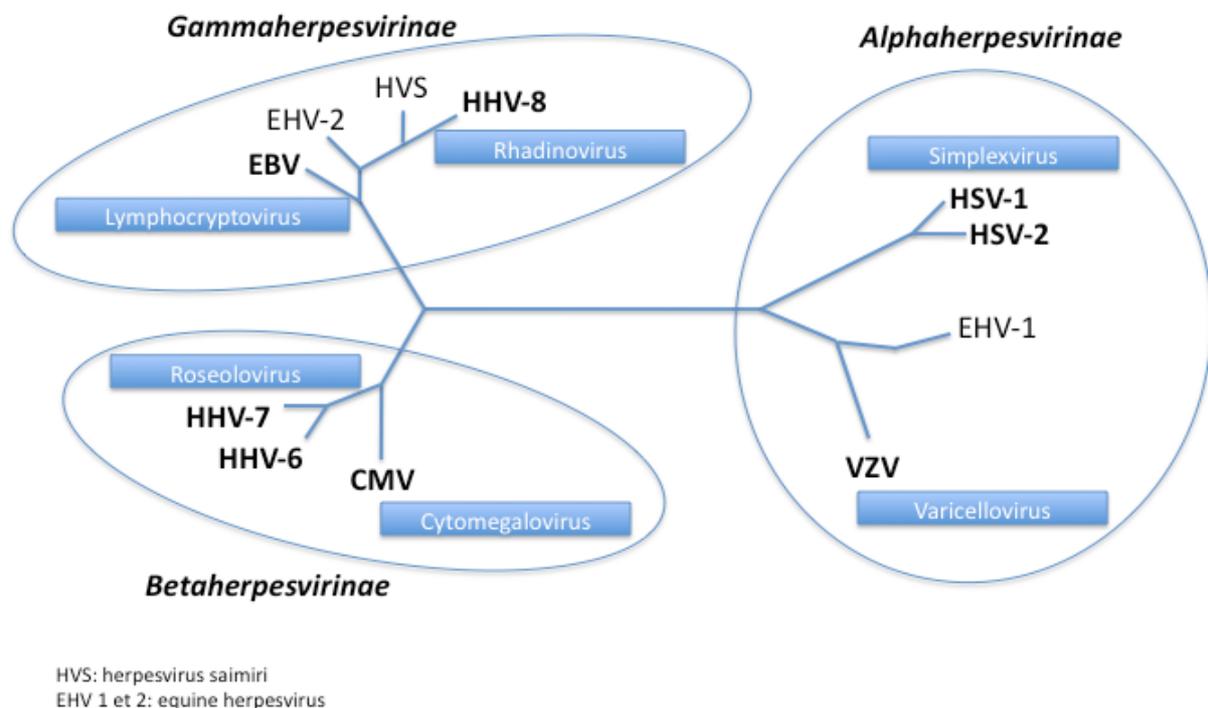


Figure 1 : Classification des herpèsvirus

La famille des *Herpesviridae* est divisée en 3 sous-familles sur la base de certaines propriétés biologiques propres à chacune (Roizman *et al.*, 1981) (Figure 1). Les *Alphaherpesvirinae*, qui comprennent les HSV 1 et 2 du genre Simplexvirus, ainsi que le virus de la varicelle et du zona (genre Varicellovirus), ont un cycle de réplication court *in vitro* d'environ 12h. Ils se multiplient dans les cellules épithéliales et établissent une infection latente dans les ganglions nerveux sensitifs. Les *Betaherpesvirinae* regroupent le cytomegalovirus (genre Cytomegalovirus) et les virus herpes humains de type 6 et 7 (genre Roseolovirus) et possèdent un cycle de réplication lent (48h). Ils persistent sous forme latente dans le sang via les

monocytes, le tissu réticulo-endothélial, les glandes sécrétoires et le rein. Les *Gammaherpesvirinae* comprennent le virus d'Epstein Barr (genre Lymphocryptovirus) et le virus herpes humain de type 8 (genre Rhadinovirus). Ils ont un cycle de réplication lent (36 à 60 h), se multiplient dans les lymphocytes B et établissent leur latence dans les tissus lymphoïdes.

1.2. Structure

Pour revue (Mocarski *et al.*, 2007)

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'un génome d'ADN bicaténaire linéaire protégée par une capsidie icosaédrique qui est séparée de l'enveloppe par le tégument (Figure 2).

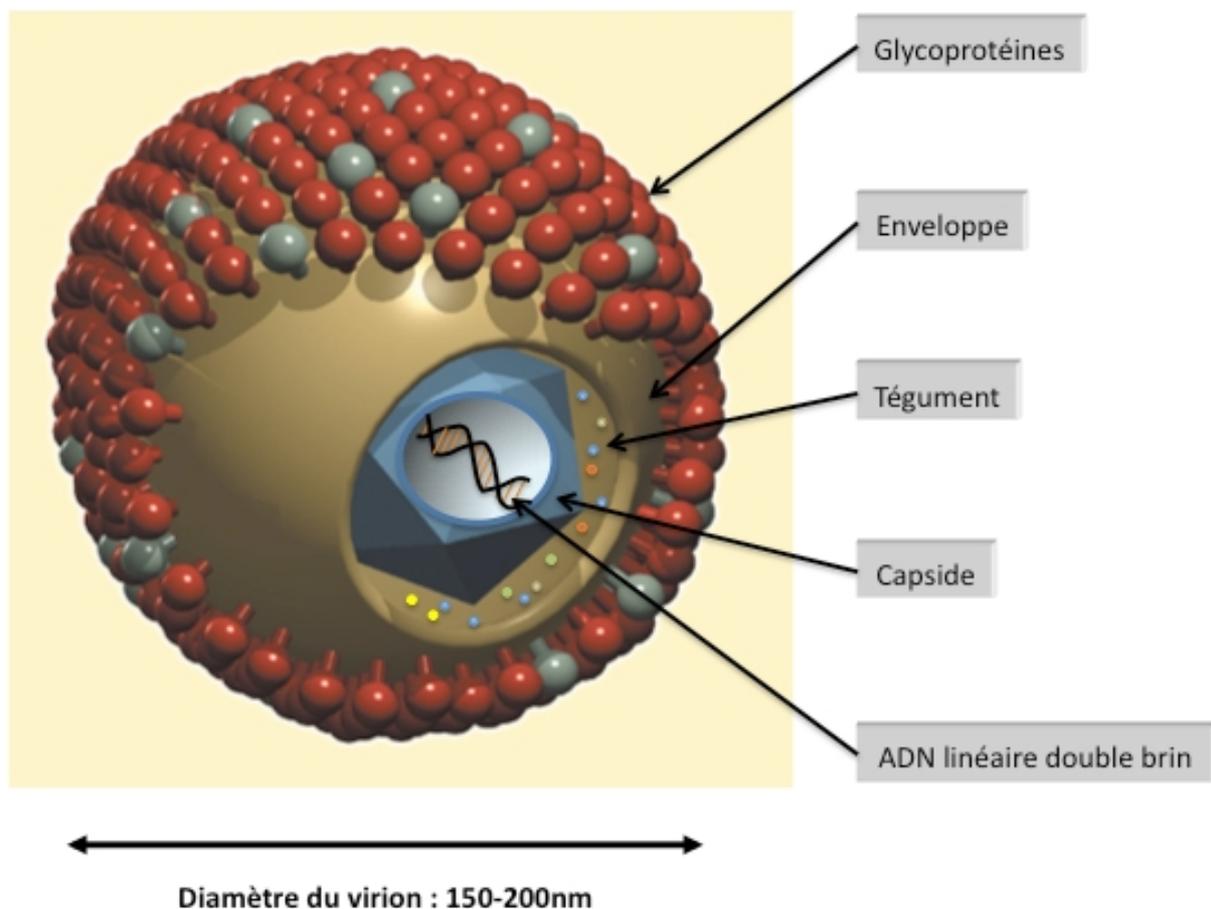


Figure 2 : Structure de particule virale du CMVH (adaptée d'après (Gandhi *et al.*, 2004))

1.2.1. L'enveloppe

L'enveloppe est constituée d'une bicouche lipidique, dérivée du bourgeonnement des membranes internes cytoplasmiques de la cellule infectée. Elle porte des glycoprotéines virales. Les plus 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 complexes notés gC I à III. Elles sont relativement bien conservées chez les herpèsvirus et portent pour certaines des épitopes spécifiques de souche. 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⁺.

L'enveloppe confère au virion une sensibilité particulière aux solvants des lipides, aux pH bas et à la chaleur.

1.2.2. Le tégment

Pour revue : (Kalejta, 2008)

Le tégment ou matrice est situé entre l'enveloppe et la capsid. Il est composé d'une vingtaine de phosphoprotéines, dont deux, 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 (ppUL32) et pp65 (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. Elle représente à elle seule 15% de l'ensemble des protéines du tégment.

Les protéines ppUL99 (pp28), ppUL82 (pp71), ppUL98a et ppUL97 comptent aussi parmi les protéines du tégment. La phosphoprotéine ppUL82 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. Quant à la protéine kinase ppUL97, elle semble jouer un rôle central dans l'infection à CMVH en agissant à différents niveaux, notamment dans la sortie de la capsid du noyau ou « *nuclear egress* » mais également dans la phosphorylation nécessaire à l'activation du ganciclovir devenant ainsi la première cible des mutations de résistance à cette molécule. Nous détaillerons plus

amplement la protéine ppUL97 dans le paragraphe portant sur la résistance du CMVH aux antiviraux.

1.2.3. La capsid

La capsid icosaédrique du CMVH, d'environ 100 nm de diamètre comporte 162 capsomères (un penton par sommet et 150 hexons). Elle 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.

1.2.4. Le 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 pour la souche de laboratoire AD169 (ATCC, VR-538), dont le génome a été entièrement séquencé (Kouzarides *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 correspondant à 82 % du génome avec 132 cadres ouverts de lecture (U_L1 à U_L132), et d'autre part, un segment unique court, U_S 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 : TRL (*Terminal Repeat Long*) et TRS (*Terminal Repeat Short*), aux extrémités du génome, IRL (*Internal Repeat Long*) et IRS (*Internal Repeat Short*), entre le segment U_L et U_S. Cette organisation permet au génome d'adopter quatre formes isomériques, présentes en quantité équimolaires, selon l'orientation des parties de la molécule (Figure 3).

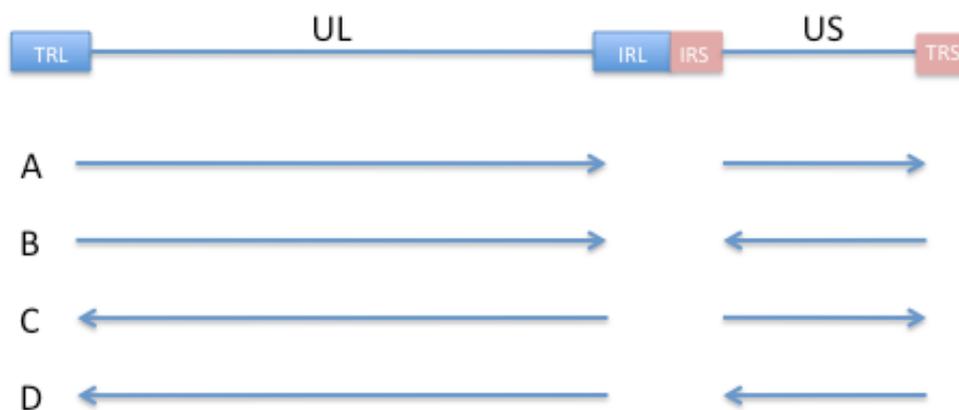


Figure 3 : Description du génome du CMVH. UL (*Unit Long*), US (*Unit Short*), TRL (*Terminal Repeat Long*), TRS (*Terminal Repeat Short*), IRL (*Internal Repeat Long*), IRS (*Internal Repeat Short*). A, B, C et D correspondent aux quatre isomères.

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 que nous détaillerons dans le paragraphe 1.3.5 (McVoy *et al.*, 1994) (McVoy *et al.*, 2000). Les génomes des isolats cliniques contiennent 13 à 15 kpb supplémentaires et ont la capacité de coder plus de 200 protéines (Cha *et al.*, 1996). A ce jour, seul un isolat clinique, la souche Merlin, a été intégralement séquencé (Dolan *et al.*, 2004). Par convention, les cadres de

lecture ouverts sont numérotés à partir de l'extrémité 5' des segments génomiques TR_L (IR_L), U_L, U_S, TR_S (IR_S) auxquels ils appartiennent et dénommés par l'indication du segment suivie du numéro. La protéine correspondante porte la même dénomination précédée de l'indication de sa caractéristique comme pp pour phosphoprotéine ou gp pour glycoprotéine. Les génomes de divers isolats sans relation épidémiologique ont 80 à 90 % d'homologie. Ils sont colinéaires et leur polymorphisme est réparti sur l'ensemble de la molécule. Des homologies de séquence avec le génome humain, et également avec les génomes des autres *Herpesviridae* ont été identifiées.

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.

Les 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 de la polymérase 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 ; ainsi, le CMVH ne se contente pas de profiter de l'immunodépression, mais participerait à son installation (Reddehase, 2000) (Gandhi *et al.*, 2004)

❖ **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.

1.3. Réplication virale

Le CMVH ne se réplique que dans des cellules humaines. La plupart des cellules semblerait être permissive à l'infection par le CMVH étant donné que l'on peut détecter le virus dans la quasi-totalité des organes d'un individu infecté. Cependant, *in vitro*, les cellules de choix pour l'isolement viral sont les fibroblastes embryonnaires qui ne sont pourtant pas les seules cellules permissives. Plus que le type cellulaire, la ploïdie et la différenciation cellulaire sont des facteurs déterminants de la permissivité. La durée du cycle de réplication, étudié dans les fibroblastes, est de 96 à 120 heures.

1.3.1. Attachement du virus et pénétration

Les récepteurs du virus sont encore mal connus. Les protéoglycanes héparine sulfate, le récepteur pour l'EGF (*Epidermal Growth Factor*) et les intégrines $\beta 1$ et $\beta 2$ sont des co-récepteurs du virus (Wang *et al.*, 2003). Les glycoprotéines d'enveloppe gB et gM interviennent dans la liaison du virus à ses récepteurs (Figure 4). La pénétration du virus se fait par fusion des membranes, les glycoprotéines gB, gH et gL interviennent dans cette étape (Compton, 2004). Cependant, la pénétration par endocytose est décrite pour les cellules endothéliales et épithéliales. La fixation des glycoprotéines d'enveloppe sur leur récepteur respectif permet une activation très précoce du métabolisme cellulaire nécessaire à la réplication de l'ADN viral, avant même l'entrée du virus. 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.

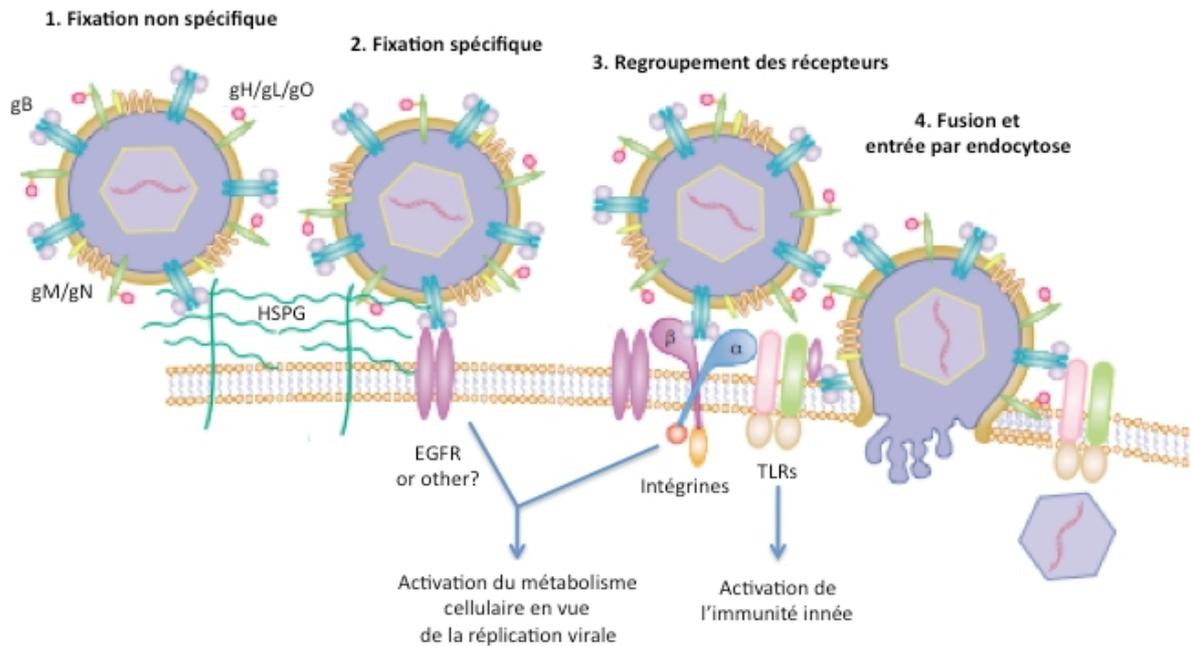


Figure 4 : Mécanisme d'entrée du virus au niveau de la membrane cellulaire

1 : Fusion non spécifique du virus au niveau des éléments de la matrice extracellulaire. 2 : Fixation spécifique des glycoprotéines d'enveloppe (gB et gH) sur des récepteurs transmembranaires permettant l'activation du métabolisme cellulaire via des protéines de la cellule hôte (PLC γ , MAPK, NF κ B, Sp1 et AP1) et l'activation des microfilaments d'actine en vue du transit vers le noyau. La fixation de gB et gH provoque un réarrangement de la membrane phospholipidique aboutissant au rapprochement des récepteurs EGFR et des intégrines. 3 : Le regroupement des récepteurs aboutit au rapprochement virus/membrane cellulaire permettant leur fusion. 4 : Endocytose de la capside et des protéines du tégment puis décapsidation de l'ADN viral et translocation vers le noyau. (D'après (Compton, 2004))

1.3.2. Evènements très précoces

La transcription du génome se déroule en trois phases coordonnées en cascade. La première, dite très précoce (*Immediate Early*, IE) débute en l'absence de synthèse *de novo* de protéines virales. Elle dure 2 à 4 heures. Les gènes très précoces majeurs IE1 et IE2 sont sous la dépendance du promoteur-activateur très précoce majeur activé par des protéines cellulaires et virales comme la protéine du tégment pp71 qui entre avec la particule virale. Les protéines très précoces majeures transactivent des gènes du CMVH et des gènes cellulaires et régulent la transcription de leur propre promoteur. 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.

Dès l'entrée du virion, la protéine pp65 est immédiatement dirigée vers le noyau et se fixe à la matrice nucléaire pour interagir avec le métabolisme cellulaire. Ainsi, le CMVH induit une réorganisation du noyau cellulaire et de la cellule pour préparer la réplication de l'ADN viral.

1.3.3. Evènements précoces : réplication de l'ADN viral

La phase précoce (*Early*, E) débute après l'expression des protéines très précoces et se termine quand commence la synthèse de l'ADN viral. *In vitro*, la réplication de l'ADN du CMVH est prolongée avec deux pics distincts de synthèse d'ADN viral observés à 18-24 heures et 60-80 heures post-infection. Les protéines précoces comprennent les enzymes et protéines nécessaires à la synthèse de l'ADN viral (Anders *et al.*, 1996). Le génome du CMVH se circularise environ 4 heures après l'infection et s'ensuit la réplication de l'ADN selon le modèle du cercle roulant. L'initiation de la réplication de l'ADN viral est effectuée par ppUL84 qui permet le déroulement de l'ADN par les trois sous-unités du complexe primase/hélicase, pUL70, pUL102 et pUL105 au niveau de l'origine de réplication *oriLyt* situé sur le segment U_L du génome. La phosphoprotéine de liaison à l'ADN simple brin ppUL57 (*single-stranded DNA binding protein*) permet quant à elle d'éviter la réhybridation des brins d'ADN. Ensuite, la polymérase virale pUL54 et sa protéine accessoire, pUL44 initient la synthèse de l'ADN viral selon le modèle du cercle roulant. 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, séparées par des séquences *pac*.

1.3.4. Evènements tardifs

La phase tardive (*Late*, L), pendant laquelle est transcrite la plupart des gènes codant les protéines de structure, commence après le début de la synthèse de l'ADN viral. Certains gènes très précoces et précoces continuent à s'exprimer durant la phase tardive. Elle correspond à la maturation de l'ADN viral, à son encapsidation dans les capsides néoformées puis à la tégumentation des virions et à leur excréation.

1.3.5. Maturation de l'ADN viral et encapsidation

Les concatémères formés sont clivés et empaquetés dans les capsides qui s'assemblent dans le noyau à la 48^{ème} heure. Ce clivage se déroule au niveau de séquences riches en nucléotides AT nommés séquences *pac* ou motifs *pac* (*pac* : *cis-acting packaging signal*) qui délimitent chaque unité de génome et sont localisées au sein des séquences terminal *a*.

L'ensemble de ce processus, nommé encapsidation ou terminaison fait appel à toute une classe de protéines : les protéines d'encapsidation ou terminases (Figure 5). 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 *et al.*, 1981, Kemper *et al.*, 1976). Les terminases du CMVH: pUL51, pUL52, pUL56, pUL77, pUL89 et pUL104 sont les homologues des protéines pUL32, pUL33, pUL28, pUL25, pUL15 et pUL6 de HSV-1 (Bogner *et al.*, 1998). Différentes études ont montré la conservation des terminases chez les herpesvirus et les bactériophages (Chee *et al.*, 1990) (Beard, 2002), ce qui a conduit Bogner et coll. à proposer un modèle théorique de ce processus chez le cytomégalo virus (Bogner *et al.*, 1998).

Les capsides préformées sont transportées au niveau des compartiments de réplication de l'ADN par les protéines pUL52 et pUL93 qui pourraient être liées à ces capsides et jouer ainsi un rôle important dans la phase précoce de l'encapsidation. La machinerie d'encapsidation est formée d'un complexe hétérodimérique terminase comprenant une sous-unité ATPase (pUL89) et d'une sous-unité de reconnaissance de la capside et de l'ADN (pUL56) (Scheffezik *et al.*, 2002). Cette machinerie s'associe à une protéine pentamérique pUL104 qui constitue un pore au niveau de la capside permettant l'introduction de l'extrémité libre du concatémère d'ADN viral néoformé. Grâce à ses domaines de liaison à l'ADN, la protéine pUL56 reconnaît les séquences *pac*, se fixe à leur niveau ce qui active le premier clivage de l'ADN et la fixation du complexe pUL56/ADN à pUL89. Puis le complexe pUL56/pUL89/ADN ainsi formé se fixe à la protéine portail pUL104 permettant le transfert de l'ADN dans la capside. Le complexe pUL56/pUL89, réalise alors le second clivage de l'ADN qui est libéré dans la capside puis le complexe se dissocie pour permettre une nouvelle encapsidation.

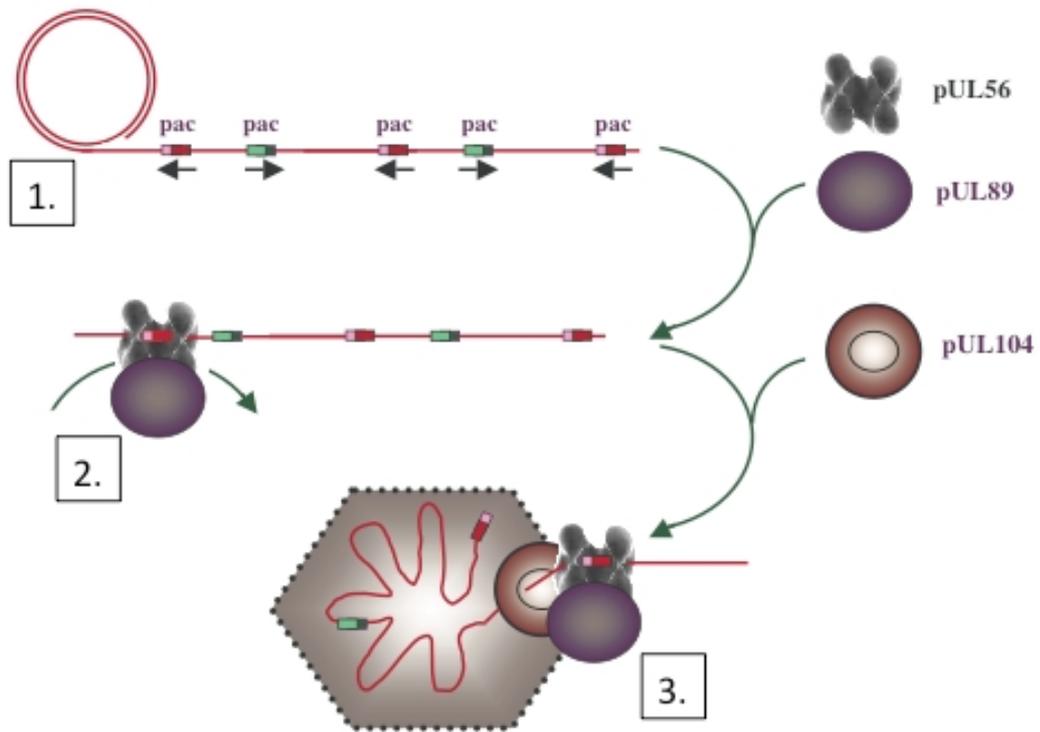


Figure 5 : Réplication et encapsidation de l'ADN viral

1. 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
2. La reconnaissance des séquences *pac*, par pUL56 permet le premier clivage de l'ADN et la fixation du complexe pUL56/ADN à pUL89.
3. Encapsidation de l'ADN viral. Le complexe pUL56/pUL89 se fixe à la protéine portail de la capsid pUL104 qui transfère l'ADN dans la capsid puis réalise le second clivage de l'ADN alors libéré dans la capsid et enfin se dissocie pour permettre une nouvelle encapsidation.

Ce mode d'encapsidation aboutit à la libération de trois types de particules : les virions complets, les corps denses (structures enveloppées de 400 à 600 nm de diamètre formées d'agrégats de protéines du tégument) et les particules non infectieuses (capsides enveloppées contenant un génome tronqué ou dépourvues de génome). Ces trois types de particules virales sont respectivement nommées particules A, B, et C.

1.3.6. Tégumentation et excrétion des virions

En quittant le noyau, la nucléocapside s'enveloppe dans la membrane interne du noyau. Cette enveloppe provisoire est ensuite perdue dans le cytoplasme. Certaines phosphoprotéines dont ppUL28, ppUL65, ppUL71 et pp150 sont également produites pendant la phase tardive. 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. L'enveloppe définitive est acquise quand la particule bourgeonne dans la lumière d'un compartiment dérivé du système sécrétoire cellulaire, le compartiment d'assemblage, de nature encore mal connue.

2. Physiopathologie de l'infection à CMVH

2.1. Tropisme cellulaire et dissémination du virus

Le CMVH a pour particularité de pouvoir infecter un grand nombre de types cellulaires (cellules endothéliales, épithéliales, fibroblastiques, dendritiques, macrophagiques, cellules nerveuses, cellules musculaires lisses et hépatocytes). De ce fait il va pouvoir infecter de nombreux tissus et ainsi être mis en évidence dans la plupart des organes. Lors de la primo-infection, le virus dissémine par voie sanguine puis une fois les différentes cellules cibles atteintes, la diffusion se fait de cellule à cellule (Figure 6). Les fibroblastes apparaissent comme une cible majeure de l'infection dans de nombreux organes tels que le placenta, le poumon, l'intestin. L'infection des cellules stromales de la moelle osseuse joue un rôle majeur dans l'inhibition de l'hématopoïèse. L'infection lytique des cellules musculaires lisses du tractus digestif conduit à des ulcérations.

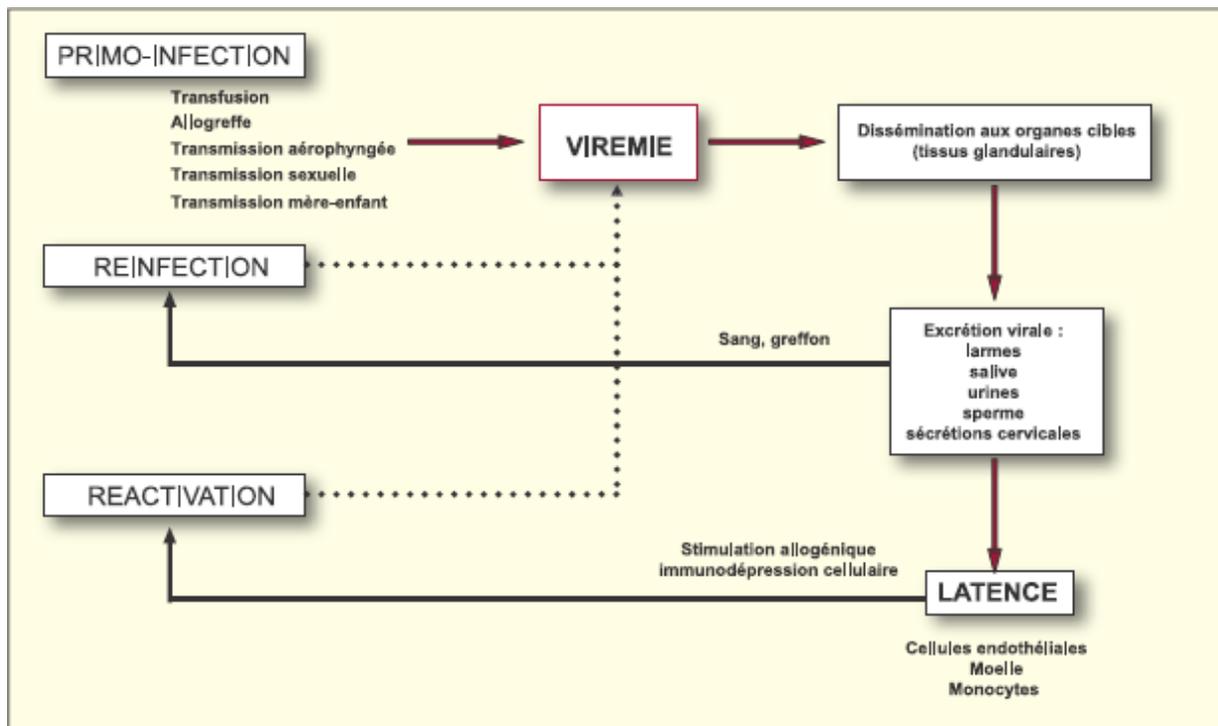


Figure 6 : Physiopathologie de l'infection à CMVH (D'après (Alain *et al.*, 2008)).

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 du virus car elles interviennent lors des phases de pénétration et d'excrétion du virus.

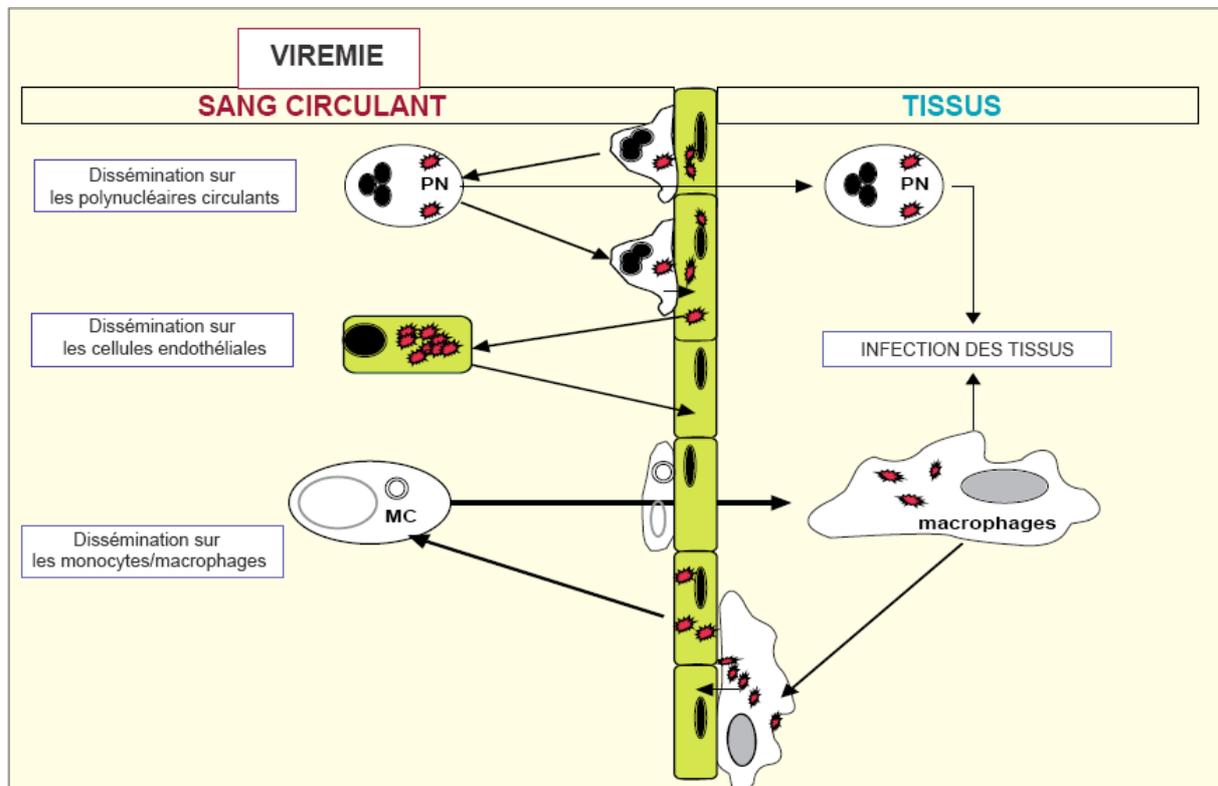


Figure 7 : Dissémination sanguine du CMVH.

Les polynucléaires circulants transportent les virions phagocytés dans les tissus infectés et s'infectent au contact des cellules endothéliales dans lesquelles le virus se réplique. Celles-ci peuvent également se détacher et migrer dans les capillaires distaux participant ainsi à la dissémination virale. La protéine du tégument pp65 (UL83) se concentre dans le noyau des polynucléaires infectés où elle est détectable par immunofluorescence. Les monocytes hébergent le virus latent et acquièrent la capacité de produire des virions lorsqu'ils se différencient en macrophages dans les tissus. (D'après (Alain *et al.*, 2008)).

Les cellules endothéliales sont aussi impliquées dans la dissémination sanguine du virus (Figure 7). En effet, les cellules endothéliales sanguines constituent 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 *et al.*, 1998) (Gerna *et al.*, 2004). Les particules virales ainsi libérées peuvent infecter les monocytes circulants et les polynucléaires, qui peuvent à leur tour le transmettre à des cellules non infectées. Cependant, aucun leucocyte du sang circulant n'est permissif pour le virus. Les cellules endothéliales

infectées recrutent des polynucléaires par la sécrétion de chimiokines (IL8 et GRO- α , notamment). Ces polynucléaires acquièrent par contact direct des particules virales et la protéine ppUL83 qui se localise dans le noyau du fait de son ciblage nucléaire. Ces cellules, qui ne sont pas siège de réplication virale, peuvent ainsi véhiculer le virus et le transmettre aux cellules endothéliales. La différenciation en macrophages ou cellules dendritiques des monocytes circulants qui hébergent le virus à l'état latent permet la réplication complète du virus (Reeves *et al.*, 2005). Les macrophages et les cellules dendritiques infectés disséminent le virus dans les tissus.

2.2. Latence et réactivation

Pour revue : (Soderberg-Naucler *et al.*, 1999)

Le cytomégalovirus persiste à l'état latent comme tous les autres herpèsvirus. L'ADN viral a été mis en évidence dans de nombreux types cellulaires (cellules endothéliales, épithéliales ou encore cellules musculaires lisses) ce qui constitue de nombreux sites potentiels de latence. Ainsi, de nombreux organes hébergent le virus à l'état latent et peuvent être impliqués dans la transmission du virus lors de transplantation. Cependant, à ce jour, la capacité d'héberger naturellement le virus latent n'a été démontrée que pour les monocytes du sang périphérique et les progéniteurs CD34+ de la moelle osseuse. Ces derniers, dont la nature exacte n'est pas connue, constituent le réservoir du virus. Chez l'individu sain, un monocyte sur 10 000 est infecté de façon latente. Le génome est sous forme d'un épisome. Ce site de latence est responsable de la transmission du virus par transfusion de produits sanguins labiles non déleucocytés provenant de donneurs séropositifs pour le CMVH. Les mécanismes moléculaires d'établissement et de maintien de la latence, et ceux de la réactivation restent peu connus, l'expression des gènes viraux dans les monocytes étant limitée aux transcrits associés à l'état de latence (transcrits des gènes IE1) (Kondo *et al.*, 1994).

Le virus se réactive périodiquement chez le sujet immunocompétent, ce qui conduit à des épisodes d'excrétion intermittente de virus dans les sécrétions respiratoires, l'urine, le sperme, les sécrétions cervicales, qui sont ainsi des sources potentielles de transmission du virus. La stimulation allogénique de monocytes en culture provenant d'individus séropositifs pour le CMVH induit leur différenciation en macrophages et la réactivation virale (Sodeberg-Naucler *et al.*, 1997). La production de cytokines, comme le TNF- α et l'interféron- γ , lors de l'alloréaction, est nécessaire à la réactivation. Le système immunitaire joue donc un rôle

complexe : il contrôle l'état de latence comme en témoigne la fréquence des réactivations chez les sujets immunodéprimés, mais l'activation immune favorise la réactivation (Sinclair *et al.*, 2006).

2.3. Réponse immune

Pour revue EMC : (Mazeron *et al.*, 2009)

2.3.1. Réponse non spécifique

L'immunité non spécifique constitue une première barrière à l'infection virale. Elle associe l'activité phagocytaire des macrophages, l'activité antivirale des interférons alpha et bêta (IFN α et IFN β) et l'activité cytotoxique des cellules NK.

2.3.2. Réponse humorale spécifique

Elle est dirigée contre un nombre restreint de protéines virales. Les plus immunogènes sont des protéines du tégment ppUL32 (pp150), ppUL83 (pp65) et ppUL99 (pp28). La quasi-totalité des individus infectés possèdent des anticorps dirigés contre ppUL32. D'autres protéines sont aussi reconnues par les sérums de nombreux individus comme la protéine majeure de capsid, la protéine d'assemblage UL80.5, les protéines non structurales très précoces majeures IE1 et IE2, l'ADN polymérase (UL54) et les protéines de liaison à l'ADN. La protéine UL44, protéine accessoire de l'ADN polymérase, est la cible principale des immunoglobulines M (IgM) synthétisées précocement par l'hôte infecté. Les glycoprotéines d'enveloppe, gB (gpUL55) et gH (gpUL75) sont la cible d'anticorps neutralisants. Le rôle de la réponse humorale dans la protection contre l'infection à CMVH est secondaire. La présence d'anticorps neutralisants à titre élevé n'empêche pas les réinfections ou réactivations, mais pourrait en limiter les conséquences.

2.3.3. Réponse à médiation cellulaire spécifique

Les lymphocytes T CD4⁺ ou auxiliaires (*helper*) jouent un rôle majeur dans la protection contre l'infection à CMVH comme le montrent la sévérité de l'infection chez les patients ayant un déficit en lymphocytes CD4⁺ et la résistance à l'infection lors de la restauration au moins partielle du nombre et des fonctions de ces lymphocytes. Ils reconnaissent dans le contexte du complexe majeur d'histocompatibilité (CMH) de classe II les antigènes viraux à

la surface des cellules présentatrices d'antigènes. Les épitopes reconnus appartiennent aux glycoprotéines d'enveloppe gB et gH, aux protéines très précoces IE1, IE2 et UL69 et à la protéine du tégument ppUL83 notamment. Le lymphocyte CD4+ activé produit des cytokines qui activent la réponse cytotoxique CD8+ ou induisent la réponse anticorps par activation des lymphocytes B. En outre, il a une activité cytotoxique vis-à-vis des cellules qui expriment les épitopes viraux dans le contexte du CMH de classe II. La réponse cytotoxique T CD8+ est indispensable au contrôle de la réplication virale. Le transfert de clones de cellules T CD8+ spécifiques de CMVH dérivées du donneur à des receveurs de moelle permet de reconstituer l'immunité cellulaire et de contrôler la réplication virale. Cependant, ce contrôle ne s'opère pas si la réponse lymphocytaire T auxiliaire est déficiente (Walter *et al.*, 1995). Les lymphocytes CD8+ reconnaissent un nombre restreint d'antigènes viraux présentés en association avec les molécules du CMH de classe I. La protéine UL83 en est une cible majeure et des épitopes dominants y ont été identifiés. La protéine très précoce majeure IE1, les glycoprotéines gB et gH, les phosphoprotéines pp150 et pp28 portent également des épitopes reconnus par les lymphocytes T CD8+ cytotoxiques.

2.3.4. Echappement au système immunitaire

Le virus, parfaitement adapté à son hôte, a développé des stratégies d'échappement à la réponse immunitaire par dissimulation, action antagoniste et détournement du système immunitaire au profit de sa dissémination.

La diffusion du virus dans l'organisme se fait essentiellement de cellule à cellule, ce qui permet au virus d'échapper à l'action des anticorps neutralisants. La fixation de la β 2-microglobuline à la surface des virions, en masquant les sites antigéniques, pourrait aussi jouer un rôle dans l'échappement à la réponse humorale. L'état de latence met le virus à l'abri des défenses immunitaires cellulaires.

L'infection à CMVH induit une diminution de la réponse lymphocytaire proliférative aux mitogènes et aux antigènes bactériens et viraux (y compris les antigènes du CMVH), une inversion du rapport des lymphocytes T CD4+/CD8+ du fait d'une augmentation du nombre de lymphocytes CD8+. La réponse CD8+ cytotoxique est diminuée. L'expression des molécules de classe I et II du complexe majeur d'histocompatibilité est inhibée par l'infection à CMVH. Le défaut d'expression des molécules de classe I est dû à l'intervention en cascade

des produits de plusieurs gènes localisés dans les régions US2-US11 conduisant à la rétention puis à la dégradation de ces molécules dans la cellule. Le CMVH réduit l'induction par l'IFN γ de la synthèse des molécules de classe II. De plus l'IFN α , produit par les cellules infectées, inhibe l'induction de l'expression des molécules de classe II par l'IFN γ (Lin *et al.*, 2007).

Le CMVH code une variété de protéines associées à l'échappement immunitaire. Quatre récepteurs de CC chimiokines (UL33, UL78, UL28 et US27) sont exprimés à différents stades du cycle lytique. Le produit du gène *UL18*, un analogue de molécule de classe I, les produits des gènes *UL16* et *UL40* inhibent l'activité cytotoxique des cellules NK par des mécanismes moléculaires différents.

Les interactions du virus avec la production de cytokines (en particulier IL1 β et TNF α), de chimiokines et des molécules d'adhésion ICAM-1 et E-selectine plaident pour un rôle du virus dans l'athérosclérose primaire, les manifestations de rejet aigu et chronique, diverses maladies inflammatoires et même certains cancers (Soderberg-Naucler, 2006).

3. Epidémiologie

3.1. Réservoir

L'homme est le seul réservoir connu du CMVH. D'autres espèces peuvent être infectées par le CMV spécifique de leur espèce et servent parfois de modèle. La physiopathologie de l'infection est étudiée chez la souris tandis que le cobaye sert de modèle pour l'infection congénitale. Jusqu'à présent, aucun animal de laboratoire n'était considéré comme sensible au virus humain mais une équipe chinoise a réussi à mettre au point un modèle d'infection par le CMVH chez des rats receveurs de greffons hépatiques (Gao *et al.*, 2007).

3.2. Modes de transmission

Lors de la primo-infection, le virus est excrété dans la salive, les sécrétions respiratoires, les urines, les larmes, les sécrétions cervico-vaginales, le sperme et le lait maternel. Le virus, sensible à la chaleur et à la dessiccation, perd rapidement son pouvoir infectieux dans le milieu extérieur. La transmission nécessite donc un contact étroit ou intime.

Le virus est transmissible par voie naturelle :

- verticalement de la mère à l'enfant, par voie transplacentaire, pendant l'accouchement ou en post-partum (notamment lors de l'allaitement)
- horizontalement par contact direct avec les liquides biologiques contaminés (voies orale, aéro-pharyngée, sexuelle).

La contamination iatrogène survient après transfusion de sang non déleucocyté, transplantation d'organes ou greffe de cellules sanguines alors que le virus est en phase de latence dans les produits du don.

3.3. Distribution de l'infection

Les infections à CMVH sont endémiques et évoluent sans influence saisonnière dans le monde entier. Dans la plupart des régions du globe, le CMVH infecte une large proportion de la population, dès le plus jeune âge. La séroprévalence varie de 40 à 100% dans le monde. Maximale lorsque les conditions socio-économiques sont précaires, elle est plus faible dans

les pays développés : en France comme en Europe de l'Ouest, elle avoisine les 50% à 50 ans (Imbert-Marcille, 2001). La séroprévalence est directement corrélée aux modes de vie qui favorisent les contaminations par les liquides corporels. Elle suit une distribution bimodale avec un premier pic pendant la petite enfance et un second chez le jeune adulte. Le premier résulte de la transmission verticale du virus et de la transmission horizontale, particulièrement fréquente entre enfants, qui excrètent du virus dans la salive, les urines et les sécrétions respiratoires durant une période prolongée. Le second pic varie selon la situation géographique et est probablement dû à une transmission sexuelle.

L'infection à CMVH est actuellement l'infection virale congénitale la plus fréquente au niveau mondial. Dans les pays industrialisés, elle touche 0,3 à 1,2% des nouveaux-nés vivants (Pass, 2005). Dans les pays en voie de développement, la prévalence est difficile à évaluer et on estime qu'au total sur la planète, 1% des enfants en moyenne est infecté par le CMVH *in utero*. Une méta-analyse récente sur ces 40 dernières années indique un taux de transmission de 32% lors d'une primo-infection maternelle et de 1,4% lors d'une réactivation (Kenneson *et al.*, 2007). Dans ce dernier cas, l'infection chez le fœtus a longtemps été considérée comme de moindre gravité, ce qui est maintenant démenti (Gaytant *et al.*, 2003). Le CMVH demeure à ce jour la première cause infectieuse de surdité congénitale dans le monde et peut être responsable de fréquentes séquelles neuro-sensorielles après transmission materno-fœtale

Chez le patient infecté par le VIH, l'infection à CMVH a représenté une pathologie opportuniste majeure, avec principalement une atteinte rétinienne, jusqu'à l'avènement des thérapies antirétrovirales hautement actives.

Chez le patient transplanté, l'infection à CMVH est la virose opportuniste la plus fréquente et représente une cause majeure de morbidité. L'immunosuppression induite pour limiter le risque de rejet du greffon favorise la réplication virale et donc les réactivations endogènes des sujets préalablement infectés par le CMVH et d'autre part les primo-infections des sujets séro-négatifs. Pendant l'année qui suit une transplantation d'organe solide, et surtout entre le 1^{er} et le 4^{ème} mois, 50% à 75% des patients présentent une primo-infection ou une réactivation (Pereyra *et al.*, 2004) (Rubin, 2000). En l'absence de prophylaxie, près de 60% des receveurs séronégatifs développent une primo-infection et 30 à 50% une maladie à CMVH, le risque étant le plus faible chez les greffés rénaux et le plus fort chez les transplantés pulmonaires. Parmi les receveurs séropositifs (60% environ), la moitié développe une infection et un quart

une maladie à CMVH (Razonable, 2005). En plus du degré et de la durée de l'immunosuppression, le statut D+/R- et les globulines antithymocytaires sont classiquement considérés comme des facteurs de risque.

4. 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.

4.1. Manifestations cliniques chez le sujet immunocompétent

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. Chez l'adulte ou le grand enfant, la forme symptomatique la plus typique correspond à un syndrome mononucléosique. La primo-infection à CMVH peut cependant aboutir à des manifestations cliniques moins fréquentes telles que des arthralgies et arthrites, colites ulcérales, pneumopathies, méningites aseptiques et myocardites. L'implication de la primo-infection à CMVH a aussi été mise en évidence dans 5 à 10 % des cas de syndrome de Guillain-Barré (Gandhi *et al.*, 2004).

La survenue de primo-infection congénitale à CMVH représente un risque pour le fœtus qui est maximum si la primo-infection survient dans les trois premiers mois de la grossesse. Les anticorps maternels anti-CMVH ont un rôle protecteur contre la transmission intra-utérine mais sont sans effet sur l'infection constituée (Fowler *et al.*, 1992). La maladie congénitale associée au cytomégalovirus est difficile à identifier et le diagnostic n'est pas toujours posé. L'infection néonatale peut être sévère réalisant le tableau de la maladie des inclusions cytomégaloïques (MIC) qui associe des signes d'infection systémique sévère (purpura, insuffisance hépato-cellulaire) à une atteinte neurologique sévère (microcéphalie, spasticité, convulsions). Cette forme grave, atteignant moins de 5% des nouveaux-nés infectés, se complique d'un décès de l'enfant dans 30% des cas et, en cas de survie, de séquelles neuro-sensorielles très sévères comme un retard mental, une surdité bilatérale et une chorioretinite. Dans les autres cas, l'atteinte est plus limitée, avec des signes cliniques moins sévères, et ne sera responsable de séquelles neuro-sensorielles que dans 30% des cas. Les nouveau-nés touchés par des infections asymptomatiques développent des séquelles auditives ou des atteintes neurologiques dans 5 à 15 % des cas (Fowler *et al.*, 1999). Ainsi, la majorité des

enfants développant une infection asymptomatique *in utero* (85 à 95 %) présente une évolution normale (Figure 8).

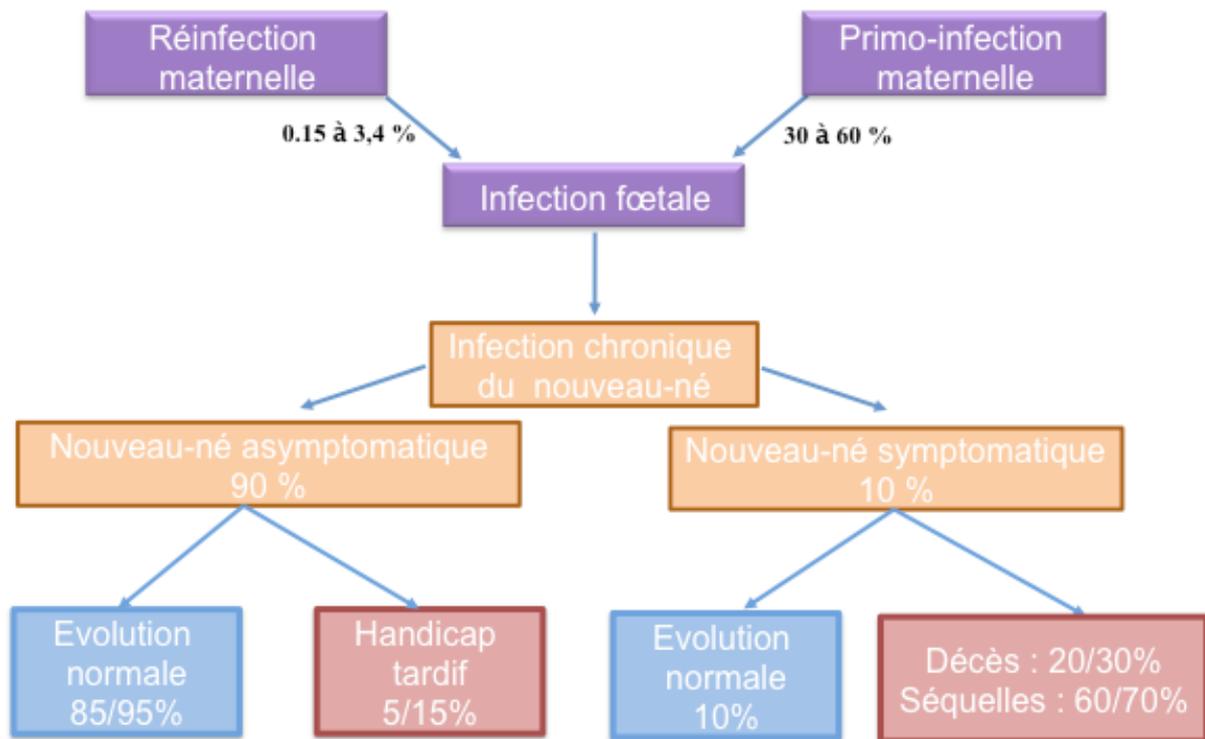


Figure 8 : Transmission materno-fœtale du cytomégalovirus.

Mise à part la contamination *in utero* à l'origine des tableaux cliniques les plus sévères, le nouveau-né peut également 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 *et al.*, 1993) (Hamprecht *et al.*, 2008).

4.2. Manifestations cliniques chez le sujet immunodéprimé

La réponse immunitaire induite par la primo-infection à CMVH 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 CMVH 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 CMVH latent ou à l'infection par une souche exogène.

4.2.1. Infection à CMVH au cours du SIDA

La majorité des patients infectés par le VIH est co-infectée par le cytomégalovirus. La mise en place, depuis 1996, de la trithérapie antirétrovirale a permis de diminuer de près de 80 % l'incidence de la maladie à CMVH (Salmon-Ceron, 2002).

L'infection à CMVH 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 (Gallant *et al.*, 1992). La manifestation clinique la plus fréquente est la rétinite à CMVH. 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+/CMVH+ 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.

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).

Le tableau clinique des atteintes digestives est dominé par des atteintes coliques asymptomatiques ou non : hémorragies digestives, diarrhées, 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). 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.

Des atteintes pulmonaires peuvent aussi survenir chez les sujets VIH+ co-infectés par le CMVH, 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 CMVH et de surinfections à *Pneumocystis carinii*, *Toxoplasma gondii*, ou *Haemophilus influenzae*.

Enfin, les infections à cytomégalovirus au cours du 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 hémiparésie de convulsion ou à un coma) et des hémorragies intra alvéolaires avec hémolyse intravasculaire (Mazeron *et al.*, 2009).

4.2.2. Infection à CMVH après greffe d'organe solide, de moelle osseuse ou de cellules souches hématopoïétiques

Afin de limiter le risque de rejet du greffon, les patients transplantés reçoivent un traitement immunosuppresseur, qui va ainsi favoriser fortement la réplication du CMVH 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. En l'absence de traitement préventif, elle survient dans les 3 premiers mois suivant la transplantation.

La conséquence directe en est l'apparition de manifestations cliniques de l'infection ou maladie à CMVH due à la lyse des cellules induite par la réplication du virus. Des définitions émanant des auteurs anglo-saxons sont devenues consensuelles (Paya *et al.*, 2004) : le patient asymptomatique développe une **infection à CMVH** lorsque la présence du virus est prouvée dans le sang circulant (virémie, ADNémie, Ag pp65). Lorsque l'infection est symptomatique, il s'agit de la **maladie à CMVH** : soit un **syndrome CMVH**, soit une **maladie invasive à CMVH**. Le syndrome CMVH associe fièvre $\geq 38^{\circ}\text{C}$ et l'un des signes suivants : malaise, leucopénie $< 3500/\mu\text{L}$, lymphocytose atypique $\geq 5\%$, thrombocytopénie, élévation des transaminases > 2 fois la normale (sauf chez les transplantés hépatiques). La maladie est invasive lorsqu'il y a dysfonction d'organe (excluant le rejet aigu de l'organe

greffé) avec preuve de la présence virale dans cet organe (biopsie, lavage broncho-alvéolaire par exemple).

Cependant, il est admis que l'infection à CMVH est aussi à l'origine d'effets secondaires associés à la production de cytokines et de chemokines au cours de la réponse immunitaire déclenchée par l'infection à CMVH et non au niveau de réplication virale (Nordoy *et al.*, 2000). Les conséquences indirectes de l'infection à CMVH sont la survenue d'infections opportunistes d'origine bactérienne (*Haemophilus influenzae*), fongique (*Pneumocystis jiroveci*) ou virale (HHV-6), le risque, 7 à 10 fois plus élevé, de développer des maladies lymphoprolifératives associées à l'EBV (Walker *et al.*, 1995), le retentissement sur la survie du greffon (rejet d'organe solide ou retard à la prise de greffe en cas d'allogreffe de moelle) et l'athérosclérose accélérée (Fishman, 2007).

4.2.2.1. Infection à CMVH et transplantation d'organes

L'incidence des maladies à CMVH chez les transplantés atteint 30 % mais varie en fonction du degré et de la durée d'immunosuppression, en particulier l'administration d'anticorps anti-lymphocytaires mono ou polyclonaux, de la survenue d'un ou plusieurs épisodes de rejet aigu conduisant à renforcer l'immunosuppression, de l'importance de la charge virale circulante, de l'existence de co-infections par les virus HHV-6 et 7 et les infections bactériennes. L'infection peut être asymptomatique ou se manifester par un tableau qui associe, *a minima*, fièvre et neutropénie. On peut aussi retrouver des lymphadénopathies, une hépatite, une thrombocytopénie, une pneumonie, une atteinte gastro-intestinale (colite, gastrite), une pancréatite, une néphrite, une chorioretinite ou plus rarement une méningoencéphalite.

Les manifestations cliniques varient aussi en fonction de l'organe transplanté. L'incidence des infections à CMVH avoisine les 25 % après transplantation de foie, de cœur ou de rein. Elle atteint les 40% après transplantation pulmonaire, 50 % après transplantation de pancréas ou de double transplantation rein/pancréas et dépasse les 50 % après double transplantation foie/cœur (Speich *et al.*, 2001) (Rowshani *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 CMVH positif (D+/R-) pourra développer une primo-infection. Il en est de même dans le cas d'une transplantation d'un organe CMVH- chez un receveur séronégatif (D-/R-) subissant une contamination post-greffe

(indépendante de la transplantation elle-même). Par ailleurs, la transplantation d'un greffon CMVH+ 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.

L'association entre infection à CMVH et rejet du greffon rénal a été démontrée il y a déjà plus de 15 ans (Pouteil-Noble *et al.*, 1993). Le rôle pivot du virus a été confirmé par des essais thérapeutiques randomisés tels que celui du valaciclovir en prophylaxie après greffe rénale dans lequel les patients à haut risque (D+/R-) bénéficiant de cette prophylaxie présentaient une réduction de 50% des rejets d'organe par rapport aux patients D+/R- sous placebo (Lowance *et al.*, 1999). Les relations entre rejet (aigu ou chronique) et CMVH semblent bi-directionnelles : le CMVH à l'origine du rejet et l'inflammation due au rejet augmentent la réplication virale. Même à bas bruit, la persistance de la réplication virale peut stimuler les lymphocytes T, aboutissant à un processus inflammatoire chronique (Fishman *et al.*, 1998).

4.2.2.2. Allogreffe de moelle

Après allogreffe de moelle ou de cellules souches hématopoïétiques, l'infection à CMVH reste une cause majeure de morbidité et de mortalité. L'instauration de traitements préventifs de l'infection (prophylaxie) ou de la maladie (traitement anticipé ou «*preemptive therapy*») a réduit la fréquence et la gravité de la maladie à CMVH dans les mois suivant la greffe et retardé sa survenue après le 100^{ème} jour (Boeckh, 1999). Si l'incidence de l'infection reste aux alentours de 60% chez le receveur séropositif, elle a diminué de 30 à 10% chez les receveurs séronégatifs (Razonable, 2005). Le facteur majeur de risque d'infection et de maladie à CMVH est la séropositivité vis-à-vis du CMVH du receveur avant la greffe, quel que soit le statut du donneur. Les autres facteurs sont la réaction du greffon contre l'hôte (GVH), l'intensité du déficit immunitaire, et la greffe à partir d'un donneur non apparenté. La pneumonie interstitielle est la manifestation la plus sévère et la plus spécifique. Avant l'instauration des traitements antiviraux, elle survenait chez près d'un tiers des receveurs, avec une mortalité de 85 à 95%. Actuellement, elle touche moins de 15% des patients, du fait des progrès des méthodes de diagnostic précoce de l'infection à CMVH et de l'instauration systématique d'un traitement anticipé. Dans un contexte fébrile, une toux, une dyspnée associée à une hypoxémie et à des infiltrats pulmonaires doivent la faire suspecter. Les autres manifestations de l'infection à CMVH sont moins spécifiques. Elles comprennent la fièvre

modérée et prolongée, le retard à la prise de greffe, avec leucopénie et thrombopénie par insuffisance médullaire secondaire, la colite ulcéreuse responsable de diarrhée ou l'hépatite cholestatique, à différencier d'une GVH, la cystite hémorragique, à distinguer d'une infection à BK virus. L'infection et la maladie à CMVH sont beaucoup moins fréquentes après autogreffe de moelle ou de cellules souches hématopoïétiques, vraisemblablement du fait d'une reconstitution immunitaire plus précoce et plus efficace (Mendes *et al.*, 2002). Les conséquences cliniques dépendent du degré d'immunosuppression nécessitée par la greffe, et peuvent être sévères en cas d'irradiation corporelle totale. La fréquence des pneumonies est de 1-6% (Konoplev *et al.*, 2001).

| | Transplantation d'organe solide | Allogreffe de moelle | VIH+/SIDA |
|------------------|--|--|---------------------------------------|
| Effets directs | Fièvre /leucopénie | Pneumonie | Rétinite |
| | Pneumonie | Oesophagite, gastrite, entérocolite | Oesophagite, gastrite, entérocolite |
| | Oesophagite, gastrite, entérocolite | Plus rarement : encéphalite, rétinite, hépatite | Neuropathie périphérique, encéphalite |
| | Hépatite | | Pneumonie |
| | Rétinite | | Hépatite |
| Effets indirects | Perte de la fonction d'organe | Infections opportunistes | Progression stade SIDA |
| | Sténose coronaire accélérée (greffe de cœur) | Mortalité augmentée | |
| | Infections opportunistes | | |
| | Rejet de greffe | | |

Tableau 1: Manifestations cliniques les plus fréquentes de l'infection à CMVH chez les patients immunodéprimés

5. Les outils diagnostiques de l'infection à CMVH

5.1. Diagnostic indirect

Le diagnostic indirect repose sur la recherche d'anticorps de différentes classes dans le sérum. Ces sérologies visent en priorité les anticorps de classe IgG ou IgM, même si certaines troupes ont été conçues pour détecter les IgA. Il existe plusieurs techniques sérologiques rapportées dans la littérature, les tests immunoenzymatiques *Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay* (ELISA) et l'agglutination passive de particules de latex sensibilisées par de l'antigène viral. En France, le test ELISA est la technique la plus utilisée. Ces tests permettent la détection des anticorps totaux, des anticorps de type IgM seuls ou IgG seuls, selon les tests utilisés. La performance des tests ELISA dépend des troupes. Pour la détection des IgM, les techniques d'immunocapture sont à privilégier car elles limitent le risque de réactions faussement positives liées à la présence de facteur rhumatoïde. Comme source protéique, les troupes utilisent soit des lysats de cellules infectées, mal définis sur le plan antigénique, qui comportent des protéines ayant des homologies avec les antigènes des autres herpès virus, soit des protéines recombinantes ou peptides synthétiques correspondant aux déterminants antigéniques essentiels de la réponse humorale. Du fait de la diversité de ces préparations antigéniques, des discordances entre les différents tests sont observées pour les valeurs proches du seuil.

Le diagnostic de primo-infection repose idéalement sur la mise en évidence d'une séroconversion. Cependant, en l'absence d'un sérum précoce, la détection des IgM est un apport indispensable pour le diagnostic tout en sachant que leur présence ne permet pas d'envisager la primo-infection avec certitude. En effet, une réapparition des IgM peut être détectée lors d'une réactivation d'un virus latent ou lors d'une réinfection. Ainsi, lorsque le diagnostic de primo-infection est indispensable (chez la femme enceinte), la mesure de l'indice d'avidité des anticorps de type IgG doit être effectuée. Cette technique permet de distinguer les IgG de faible avidité, synthétisées lors d'une primo-infection, des IgG de forte avidité, synthétisées lors des infections secondaires ou anciennes. Son principe repose sur un lavage à l'urée qui permet de décrocher les IgG de faible avidité.

Dans le cadre de la transplantation, le sérodiagnostic permet de déterminer avant la greffe le statut immunitaire du donneur et du receveur vis à vis du CMVH avec la recherche des

immunoglobulines type IgG. L'immunosuppression iatrogène post-greffe ne laisse pas beaucoup de place au diagnostic indirect. Les IgM puis les IgG seront détectables lors d'une primo-infection chez un patient R- mais elles peuvent également être présentes lors d'une réactivation ou d'une réinfection. Chez les patients R+, les IgG déjà présentes avant la greffe peuvent augmenter en cas de réactivation ou de réinfection. Ainsi, le sérodiagnostic n'est pas adapté au suivi du patient transplanté car il est le plus souvent retardé. Enfin, des réactions croisées ont été décrites entre la sérologie CMVH et celle des autres β -herpèsvirus (HHV-6 et HHV-7).

5.2. Diagnostic direct

5.2.1. Prélèvements

Le virus entier, son génome ou ses antigènes sont recherchés principalement dans le sang mais aussi dans divers échantillons tel que les urines, les sécrétions pharyngées, les liquides de lavage broncho-alvéolaire (LBA), le liquide céphalo-rachidien (LCR), les biopsies, le liquide amniotique, les tissus fœtaux. La salive peut être utilisée pour des études épidémiologiques, toutefois ce prélèvement n'a jamais été validé en clinique humaine.

Chez l'immunodéprimé, la surveillance de la charge virale sanguine permet d'anticiper les complications viscérales de l'infection. Chez les receveurs d'allogreffe, quel que soit le type de transplantation, une surveillance hebdomadaire de la charge virale est habituellement instituée après la greffe et poursuivie sur les trois premiers mois. Au cours du SIDA, la surveillance virologique n'intervient que chez les patients dont le nombre de lymphocytes CD4+ est inférieur à 100/mm³. Le sang est prélevé sur un anticoagulant (héparine pour la culture ou la recherche de l'antigénémie, EDTA ou citrate pour la recherche d'acides nucléiques) et acheminé au laboratoire à température ambiante dans un délai qui ne doit pas excéder 2 ou 3 heures. Quand ils sont destinés à l'isolement viral en culture cellulaire, les échantillons cliniques autres que le sang sont recueillis dans un milieu de transport plus riche en sucre que celui utilisé pour l'herpes, puis immédiatement acheminés à +4°C au laboratoire pour y être rapidement mis en culture. Les prélèvements peuvent être conservés à +4°C pendant au maximum 48 heures ou à -80°C si la durée de conservation est supérieure.

5.2.2. Examen cytologique

L'examen cytologique peut être effectué à partir de coupes de biopsies, de frottis, ou après cytocentrifugation ou étalement sur lame de liquides biologiques tels les lavages broncho-alvéolaires (LBA) ou le liquide amniotique (Mazeron *et al.*, 2009). Les cellules infectées *in vivo* sont de grande taille et possèdent des inclusions intranucléaires et intra cytoplasmiques. L'aspect le plus caractéristique est "l'inclusion en œil de hibou", qui est une volumineuse inclusion intranucléaire séparée de la membrane nucléaire par un halo clair (Figure 9).

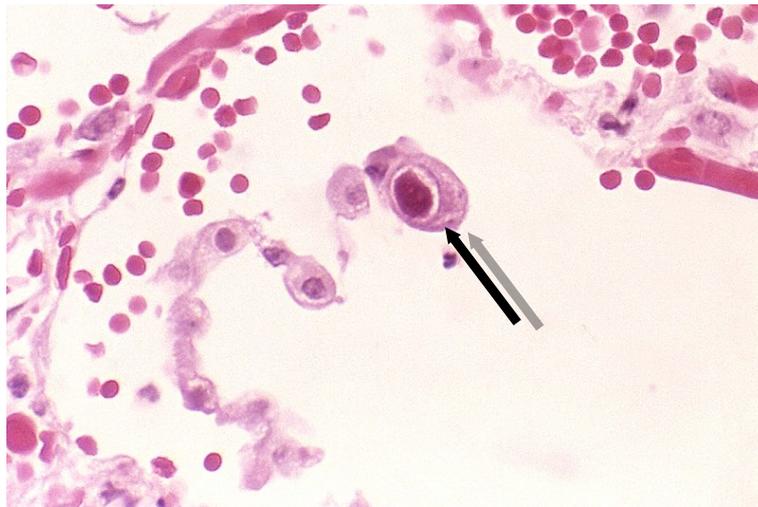


Figure 9: Aspect caractéristique en œil de hibou d'une cellule infectée par le CMVH (épithélium respiratoire). Crédit photo :CDC/Dr. Edwin P. Ewing, Jr. (PHIL #958), 1982.

5.2.3. Isolement viral en culture cellulaire

La culture cellulaire est la technique historique et reste le « *gold standard* ». Même si son délai de réalisation et son manque de sensibilité n'en font plus une technique diagnostique de premier choix, elle garde néanmoins toute sa place car elle est la seule permettant de disposer des souches virales, de les conserver et de les caractériser.

Elle consiste en l'inoculation des prélèvements sur des fibroblastes embryonnaires humains de poumon (cellules MRC-5). L'effet cytopathique (ECP) apparaît en 8 à 20 jours mais parfois plus tardivement. Il est constitué de foyers dont l'extension suit le grand axe des fibroblastes, ces derniers augmentant de volume et devenant réfringents. L'aspect caractéristique est décrit classiquement à foyers en « banc de poissons » (Figure 10). Cette

relative lenteur de la culture peut être un handicap notamment en cas d'infection concomitante avec un virus à cycle de réplication rapide comme l'Herpes Simplex.

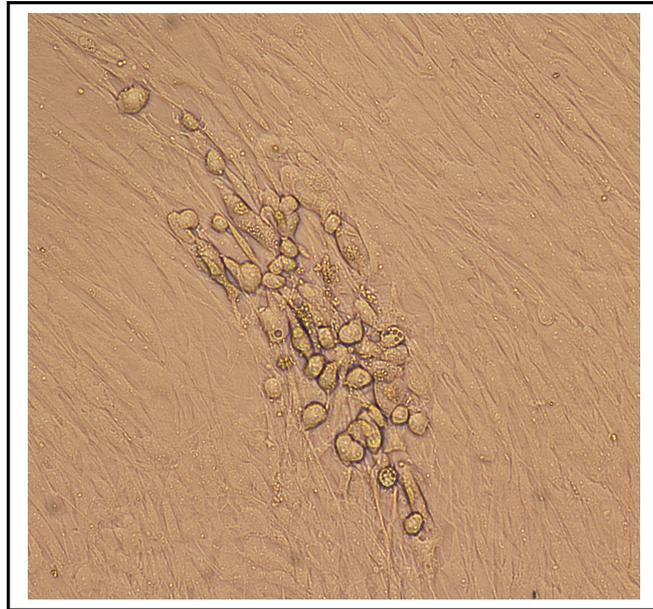


Figure 10: Isolement du CMVH en culture virale. L'effet cytopathique observé du CMVH est classiquement décrit à foyers en « banc de poissons». Crédit photo, laboratoire de Bactériologie-Virologie-Hygiène, CHU Limoges

La culture dite rapide supplante l'isolement classique pour le diagnostic. Elle associe une centrifugation des prélèvements sur les fibroblastes, qui favorise l'adsorption du virus, et la détection par immunocytochimie ou immunofluorescence, après 24 à 48 heures d'incubation, des antigènes très précoces synthétisés au cours du premier cycle de réplication virale (Mazeron *et al.*, 1992) (Figure 11). Comparée à l'isolement classique, la culture rapide permet de détecter le virus avec une plus grande sensibilité dans les prélèvements contenant du virus extra cellulaire (urines par exemple) et avec une sensibilité équivalente dans les prélèvements contenant du virus lié aux cellules (sang par exemple). L'avantage de cette technique est un délai court de réponse compatible avec la prise en charge thérapeutique des patients. En revanche, elle ne permet pas l'isolement de la souche.



Figure 11: Détection du cytomégalovirus par culture rapide. Les antigènes très précoces du virus, localisés dans le noyau du fibroblaste infecté, sont révélés par immunopéroxydase indirecte à l'aide de l'anticorps monoclonal E13 (Argène Biosoft). (Photo : Dr Marie-Christine Mazon)

5.2.4. Antigénémie

L'antigénémie est la mise en évidence par immunofluorescence indirecte de la phosphoprotéine virale pp65 (ppUL83) dans les noyaux des polynucléaires circulants (Figure 12). Elle reflète donc l'infection active à CMVH. En France, deux trousse diagnostiques sont commercialisées par les sociétés Argène (Varilhes, Ariège) ou Biostest (Buc, Yvelines). Le résultat est exprimé en nombre de polynucléaires positifs pour 200 000 cellules examinées. Cette technique manuelle, de réalisation rapide (2 à 3 heures), nécessite des échantillons frais (< à 2 heures). Elle n'est donc adaptée qu'à l'urgence et/ou à la réalisation de petites séries.

La sensibilité est intermédiaire entre celle de l'isolement viral et le diagnostic par biologie moléculaire. Chez les patients en agranulocytose, elle peut être prise en défaut du fait de l'absence de polynucléaires.

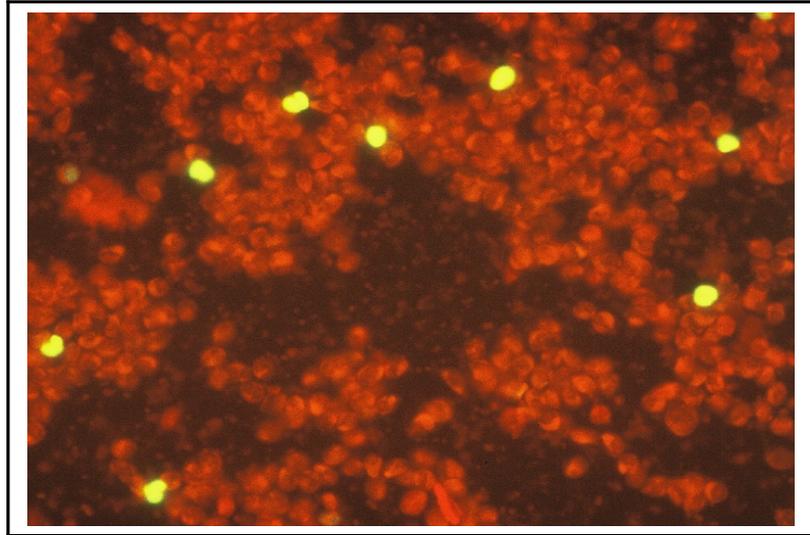


Figure 12: Antigénémie pp65. Les cellules fluorescentes sont des polynucléaires marqués par un anticorps anti-pp65. Crédit photo, laboratoire de Bactériologie-Virologie-Hygiène, CHU Limoges.

5.2.5. Diagnostic par biologie moléculaire

Le diagnostic de l'infection peut s'appuyer sur la recherche directe des acides nucléiques viraux (ADN ou ARN). Depuis plus de 15 ans, de nombreuses trousse de biologie moléculaire ont été mises au point pour faciliter la mise en œuvre et améliorer la standardisation. Certaines permettent la détection de l'ADN viral: 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 (Quantiplex bDNA CMV, Bayer). D'autres, détectant des ARN messagers viraux, utilisent la technique NASBA (Nucleic Acid Sequenced Based Amplification) : Nuclisens™ CMVH pp67 Assay ou Nuclisens™ CMVH IE Assay, Organon Teknika (Pellegrin *et al.*, 2000) (Caliendo *et al.*, 2003) (Piiparinen *et al.*, 2004).

Le diagnostic par biologie moléculaire se fait aujourd'hui dans l'immense majorité des cas par PCR en temps réel permettant une quantification de la charge virale avec l'utilisation d'une gamme externe et éventuellement d'un contrôle interne. La quantification de la charge virale permet d'évaluer la cinétique de l'expression virale chez un sujet et ainsi d'adapter au mieux la stratégie thérapeutique, tout particulièrement chez le sujet transplanté. Le développement de la PCR en temps réel a facilité la diffusion des « techniques maisons » et de nouvelles trousse ont été mises au point, les trousse de détection des ARN messagers et

les techniques de PCR qualitative ayant été progressivement abandonnées. La PCR en temps réel fait appel à différentes chimies utilisant des agents intercalants ou des sondes. Parmi ces dernières, la chimie Taqman est probablement la plus utilisée pour la PCR CMVH.

Cette PCR peut être effectuée à partir d'un prélèvement périphérique de sang total sur EDTA mais est également applicable au plasma ou au sérum ainsi qu'à tout liquide biologique de l'organisme (salive, urines, lavage broncho-alvéolaire). Dans le sang circulant, on peut rechercher l'ADN du CMVH dans les différents compartiments : plasma, leucocytes ou sang total. Cependant, la présence d'ADN dans l'un ou l'autre des compartiments ne présente pas toujours la même signification car la corrélation entre sang total et sérum ou plasma n'est pas optimale même si elle reste acceptable ($r= 0,6$ à $0,7$) (Mengelle *et al.*, 2003) (Garrigue *et al.*, 2008). Une PCR positive dans le plasma signe une infection active mais inversement, lors d'une infection active, la PCR peut être négative dans ce même compartiment car le virus est d'abord détecté en premier lieu dans les cellules et la charge virale plasmatique n'est pas toujours suffisamment élevée pour être détectée précocement (von Muller *et al.*, 2007). Le compartiment cellulaire semble plus adapté mais l'utilisation des leucocytes nécessite une préparation qui alourdit la technique. Le sang total apparaît donc comme un bon compromis entre plasma et cellules (Deback *et al.*, 2007). Il doit être homogénéisé au laboratoire par agitation douce, puis être aliquoté pour un stockage à -80°C jusqu'à extraction. Les résultats sont généralement exprimés en copies/mL de sang ou de la matrice utilisée. Pour une meilleure appréhension par le clinicien du résultat, une échelle logarithmique est fréquemment utilisée. Cinq troussees commerciales et quatre méthodes « artisanales » sont utilisées dans les laboratoires français (Alain *et al.*, 2008). Leurs caractéristiques sont résumées dans le Tableau 2. Les résultats divergent pour un même échantillon suivant les méthodes utilisées jusqu'à $0,7$ log/mL (Gouarin *et al.*, 2007). Ainsi il est fortement recommandé de réaliser une surveillance par le même laboratoire pour un patient donné. Par ailleurs pour toutes ces techniques il faut distinguer seuil de détection et seuil de quantification. Le seuil de détection varie entre 150 et 1000 copies/mL (Gouarin *et al.*, 2007) alors que le seuil de quantification, seuil à partir duquel la gamme est linéaire se situe généralement au delà de 1000 copies/mL. Ce taux de 1000 copies/mL est le taux généralement retrouvé lors de la première détection d'une infection active après transplantation (Kamar *et al.*, 2008).

Le virus latent est présent dans de nombreuses cellules et les résultats des PCR, classiques ou en temps réel, doivent être interprétés en fonction du contexte clinique, de l'examen anatomopathologique ou de la culture virale témoignant de la présence de virus infectieux. La détection d'une charge virale élevée dans le L.B.A. (dans les pneumonies à CMVH) ou dans les biopsies digestives (colites ou rectites à CMVH) constitue un indicateur de réplication virale locale (Zedtwitz-Liebenstein *et al.*, 2004).

| TECHNIQUES COMMERCIALES | | | | | |
|--|--|---|---|--|--|
| Méthode | CMV R-gene™ (Argène) (CE) | Light Cycler® CMV Quant Kit (Roche Diagnostics) (CE) | Light Cycler® CMV Quant Kit (Roche Diagnostics) | Artus PCR CMV kit (Qiagen) (CE) | Cobas Amplicor CMV Monitor system (Roche Diagnostics)* |
| Auteurs | (Gouarin <i>et al.</i> , 2007) | (Tang <i>et al.</i> , 2008) | | (Michelin <i>et al.</i> , 2008) | (Alice <i>et al.</i> , 2006) |
| Automate | LightCycler® 1.0 LightCycler® 2.0 ABI PRISM 7500 | LightCycler® 2.0 | LightCycler® 2.0 | LightCycler® 2.0 | Cobas Amplicor |
| Cible | UL83 | UL54 | UL54 | Major immediate early gene | UL54 |
| Nature de l'échantillon | ST | Plasma | ST | Plasma | PBL |
| Seuil de détection | 150 copies/mL | 235 copies/mL | 208 copies/mL | 139 copies/mL | 100 copies/10 ⁶ PBL |
| Méthode d'extraction utilisée pour la validation du seuil | Manuelle : QIAamp DNA minikit Automate : Magna Pure LC et Compact | Automate : Magna Pure LC et Compact (Roche Diagnostics) | Automate : Magna Pure LC et Compact (Roche Diagnostics) | Automate : EZ1 (Qiagen) | Manuelle : Cobas Amplicor (Roche Diagnostics) |
| TECHNIQUES ARTISANALES | | | | | |
| Auteurs | (Gault <i>et al.</i> , 2001) | (Leruez-Ville <i>et al.</i> , 2003) | (Mengelle <i>et al.</i> , 2003) | (Najioullah <i>et al.</i> , 2001) | |
| Automate | ABI Prism 7700 Light Cycler® 1.0 | ABI Prism 7700 | Light Cycler® 1.0 | ABI Prism 7700 | |
| Cible | UL83 | UL123 | UL83 | US8 | |
| Nature de l'échantillon | ST | ST | ST, PBL | ST | |
| Seuil de détection | 500 copies/mL | 250 copies/mL | 10 copies/réaction | 200 copies/mL | |
| Méthode d'extraction utilisée pour la validation du seuil | Manuelle: QIAamp DNA mini kit (Qiagen) | Manuelle: QIAamp DNA mini kit (Qiagen) | Automate : Magna Pure LC (Roche Diagnostics) | Manuelle: QIAamp DNA mini kit (Qiagen) et High Pure Viral Nucleic Acid Kit (Roche Diagnostics) | |

Tableau 2: Exemples de techniques commercialisées et de techniques artisanales illustrant la diversité des méthodes utilisées pour quantifier la charge virale circulante. ST : sang total, PBL : leucocytes du sang périphérique. * La méthode Cobas Amplicor (Roche Diagnostics) a été la première PCR quantitative automatisée pour le CMV. Très largement utilisée dans les essais cliniques, elle sert donc ici de référence. Son principe est celui d'une quantification à l'aide d'une gamme étalon externe, et non d'une RT-PCR. D'après (Alain *et al.*, 2008).

6. Traitement des infections à CMVH

Pour revue : (Hantz *et al.*, 2009)

6.1. Molécules antivirales

6.1.1. Inhibiteurs de l'ADN polymérase virale

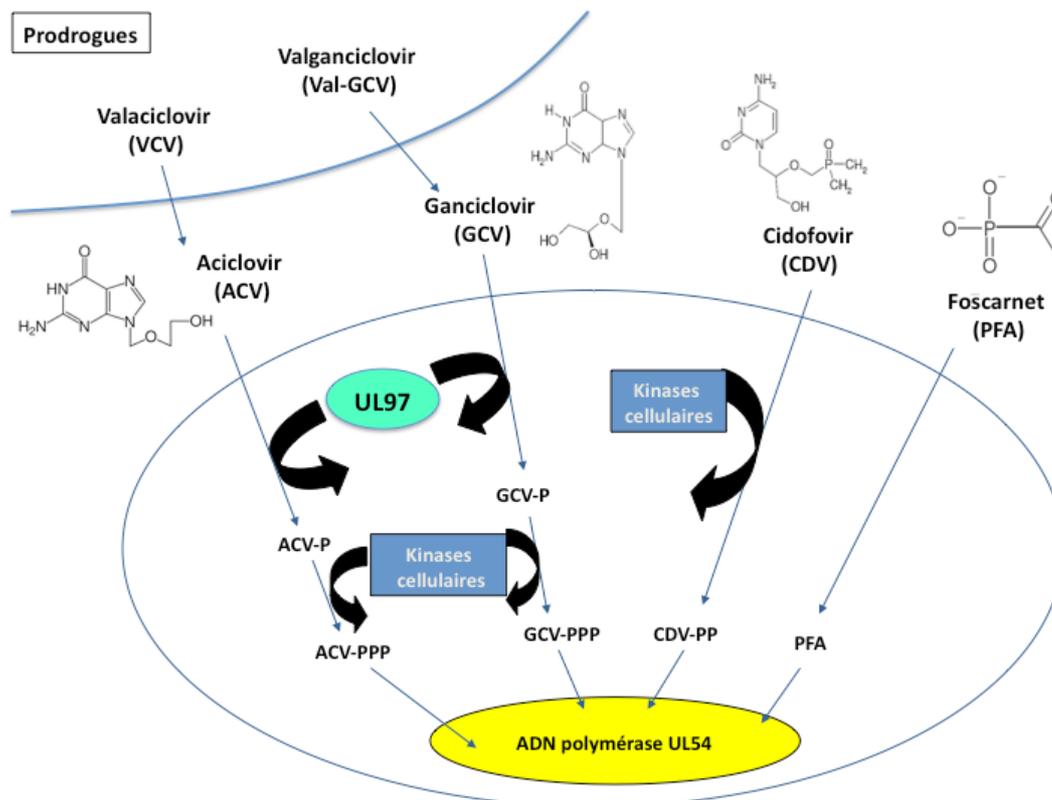


Figure 13 : Mode d'action des inhibiteurs de l'ADN polymérase virale UL54.

Les analogues nucléosidiques : le GCV (ainsi que l'ACV, utilisé uniquement en prophylaxie) nécessite une primophosphorylation par la protéine kinase virale UL97 puis deux phosphorylations par des kinases cellulaires pour être actif. Deux promédicaments du GCV et de l'ACV, respectivement le Val-GCV et le VCV, ont été développés afin d'améliorer la biodisponibilité orale de ces molécules. Le CDV nécessite deux phosphorylations par des kinases cellulaires pour être actif. Il est donc indépendant de la protéine kinase virale UL97.

L'analogue du pyrophosphate : le PFA est directement actif dans la cellule. Il se fixe au niveau du site catalytique de l'ADN polymérase UL54.

Trois molécules sont disponibles pour le traitement des infections à CMVH : un analogue nucléosidique, le ganciclovir (Cymevan[®], Roche), un analogue nucléosidique monophosphaté le cidofovir (Vistide[®], Pfizer), et un analogue de pyrophosphate inorganique, le foscarnet (Foscavir[®], AstraZeneca) ou phosphonoformate. L'aciclovir et son promédicament, le valaciclovir (Zelitrex[®], Glaxo-Smith-Kline) sont utilisés uniquement en prophylaxie. Toutes ces molécules inhibent l'activité de l'ADN polymérase virale UL54 et sont donc sans action sur le virus latent (Figure 13).

6.1.1.1. Ganciclovir (GCV) et valganciclovir (Val-GCV)

Le GCV ou 9-(1,3-dihydroxy-2-propoxyméthyl)-guanine est un analogue acyclique de la désoxyguanosine utilisé depuis 1983. Il fut le premier agent antiviral homologué pour le traitement de l'infection à CMVH et reste la molécule de choix, en première ligne, pour le traitement de l'infection et de la maladie à CMVH chez les transplantés.

Le GCV est actif sous forme triphosphate. La primo-phosphorylation est réalisée par une sérine/thréonine kinase virale, la phosphoprotéine pUL97. Le GCV monophosphate (GCV-P) est ensuite di- puis tri-phosphorylé (GCV-PPP) par des kinases cellulaires. Le GCV-ppp inhibe l'ADN polymérase virale par compétition avec les nucléosides, substrats naturels de l'enzyme, ce qui inhibe l'élongation de la molécule d'ADN en cours de synthèse par blocage du site catalytique. Sa concentration inhibitrice 50% (CI₅₀) sur les souches sensibles est comprise entre 2,5 et 8 µM selon les méthodes.

Le GCV peut être administré par voie orale, intraveineuse ou intravitréenne. La demi-vie plasmatique est de 2,5 heures après administration intraveineuse. La biodisponibilité du GCV administré par voie orale n'excède pas 10 %. Pour pallier à cette faible biodisponibilité per os, un promédicament, le Val-GCV, dérivé L-valyl-ester du GCV, a été développé. Après métabolisation en GCV dans le foie et dans la paroi intestinale, la biodisponibilité atteint 60 % après administration orale, ce qui permet d'atteindre des concentrations plasmatiques équivalentes à celles obtenues par le GCV intra-veineux. Des implants intravitréens de GCV (Vitrosert[®], Bausch and Lomb) ont été développés pour le traitement local des rétinites chez les sujets atteints du SIDA.

Le GCV et le Val-GCV sont éliminés par voie rénale. Leur principal effet indésirable est la toxicité hématologique : après trois mois de traitement par voie intraveineuse, 40 % des sujets présentent des leuconeutropénies sévères et 15 % des thrombocytopénies. Plus rarement, ces

molécules peuvent provoquer des troubles neurologiques tels qu'ataxie, coma, ou crises convulsives. Enfin des troubles rénaux de type hématurie et hypercréatinémie ont aussi été décrits.

6.1.1.2. Cidofovir (CDV)

Le CDV ou 1-(3-hydroxy-2-phosphonylméthoxypropyl)-cytosine est un analogue de la désoxycitidine monophosphate. Ainsi, contrairement au GCV, le CDV doit seulement être diphosphorylé (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 kinase pUL97. Le CDV est un puissant inhibiteur de l'ADN polymérase virale, comme en témoigne une CI_{50} de 0,5 à 1 μ M sur les souches sensibles. Le CDV est administré exclusivement par voie intraveineuse, cependant il a une demi-vie longue qui varie de 17 à 65 jours selon les études et les sujets, ce qui permet d'en espacer l'administration. Le développement de promédicaments ou esters de CDV utilisables par voie orale est en cours.

Le principal effet indésirable de son administration est une toxicité rénale (protéinurie et hypercréatinémie), ce qui nécessite une bonne hydratation et l'administration concomitante de probénécide. Ont été décrits plus rarement fièvre, asthénie, alopecies, uvéites antérieures, rash cutané, diminution de la pression intraoculaire ou neuropathie périphérique (Gandhi *et al.*, 2004).

6.1.1.3. Foscarnet ou phosphonoformate (PFA)

Le PFA ou phosphonoformate est un analogue de pyrophosphate inorganique. 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. Utilisé le plus souvent en deuxième intention, il est cependant préféré au GCV chez les patients neutropéniques. Son action est synergique avec celle du GCV ce qui permet de l'utiliser en association avec celui-ci. Sa CI_{50} sur les souches sensibles est plus variable, comprise entre 40 et 400 μ M.

Le PFA est administré par voie intraveineuse en perfusion de 1,5 à 2 heures. Sa demi-vie plasmatique varie entre 2,4 et 6 heures. Les principaux effets indésirables touchent la fonction rénale (hypercréatinémie et insuffisance rénale). L'administration de PFA doit donc s'accompagner d'une hydratation importante et d'une surveillance accrue de la clairance de la créatinine. La détérioration de la fonction rénale induit d'autres troubles: une hypocalcémie, une anémie ou des crises convulsives (Gandhi *et al.*, 2004). Des troubles digestifs à type de nausées et vomissements sont également rapportés.

6.1.1.4. Aciclovir (ACV) et valaciclovir (Val-ACV)

L'ACV 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 et cette molécule est utilisée uniquement dans le traitement prophylactique des infections à CMV chez les sujets immunodéprimés. 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 protéine kinase pUL97.

L'ACV et sa prodrogue le Val-ACV ont une biodisponibilité par voie orale respectivement de 15 % et de 54 %. Leur demi-vie plasmatique est de 2 à 3 heures et leur élimination est rénale. L'ACV est le plus souvent très bien toléré, quelques effets indésirables rares peuvent cependant survenir tels une néphropathie réversible et des troubles digestifs ou neurologiques.

6.1.2. Oligonucléotides antisens

Le fomivirsen (Vitravene[®], distribué par Ciba-Vision, non disponible en France) est un oligonucléotide antisens de 21 bases complémentaire d'une séquence de l'ARN messager très précoce «*major immediate-early 2 (IE2)*» codant une protéine qui régule l'activité d'un grand nombre de promoteurs de gènes viraux et cellulaires. Le fomivirsen inhibe ainsi l'entrée du virus dans le cycle de réplication. Il est actif sur les souches résistantes au GCV, CDV et PFA. Il 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 de SIDA (Vitraven Study group 2002). Ce composé a été retiré du marché européen en 2002 pour des raisons commerciales mais reste disponible en Suisse et aux Etats-Unis. L'effet indésirable le plus fréquemment retrouvé était l'inflammation de la cornée, qui peut être traitée par des corticoïdes locaux.

6.1.3. Immunoglobulines intraveineuses

Les immunoglobulines sont parfois proposées seules ou en association avec la chimiothérapie antivirale sous forme d'immunoglobulines polyvalentes (Tégéline[®], LFB Biomédicaments) ou d'immunoglobulines spécifiques anti-CMVH (Cytotect Biotest).

6.2. Stratégies thérapeutiques des infections à CMVH

6.2.1. Prise en charge de l'infection materno-fœtale

L'infection congénitale constitue un problème majeur de santé publique. Le fœtus est infecté à l'occasion de la virémie maternelle dans 30 à 50% des cas de primo-infection et dans moins de 5% des cas d'infection secondaire. La dissémination chez le fœtus se fait alors par voie hématogène et toutes les cellules fœtales peuvent être infectées, y compris celles du cerveau. Un petit pourcentage de nouveau-nés développe une maladie sévère, associée à une mortalité à court ou moyen terme dans 30% des cas. La très grande majorité (70 à 80%) des enfants infectés *in utero* ne présente aucune séquelle à long terme de cette infection. Cependant, 10 à 15% d'entre eux ont une surdité uni ou bilatérale et les 10 à 15% restant ont des séquelles neuro-sensorielles sévères accompagnées d'un retard psychomoteur (Fowler *et al.*, 1992). La presque totalité des formes symptomatiques survient après primo-infection maternelle en cours de grossesse ou juste avant la conception (Adler *et al.*, 2007). Les femmes au contact des jeunes enfants sont les plus exposées, du fait de l'excrétion abondante et prolongée du virus dans les urines et dans la salive. Ainsi, la prévention de l'infection congénitale repose sur des règles simples d'hygiène visant à éviter le contact avec la salive, les urines, et en pratique tout liquide biologique de l'enfant (Cannon *et al.*, 2005). Cependant ces règles assez astreignantes sont difficiles à appliquer en pratique.

6.2.1.1 Traitement de l'infection fœtale

A ce jour, aucun traitement pendant la grossesse n'a été validé mais deux pistes thérapeutiques basées l'une sur l'utilisation d'antiviraux l'autre sur l'administration d'immunoglobulines spécifiques sont en cours d'étude.

Les antiviraux :

Le GCV, le PFA et le CDV sont contre-indiqués en raison de leur toxicité et de leur potentielle tératogénicité. Le VCV est la seule molécule active contre le CMVH que l'on puisse actuellement envisager d'utiliser pendant la grossesse. En effet, le VCV a été largement utilisé chez la femme enceinte dans les trente dernières années pour le traitement des infections à herpes simplex virus et les données de pharmacovigilance sont très rassurantes. L'analyse du registre du laboratoire Welcome, qui avait répertorié 1234 femmes exposées à l'ACV entre juin 1984 et avril 1999 (dont 756 exposées au 1er trimestre), n'avait pas mis en évidence de syndrome malformatif particulier, ni d'augmentation significative du risque malformatif (Kimberlin *et al.*, 1998). Par ailleurs, il a été montré récemment que le VCV avait une bonne biodisponibilité chez le fœtus lorsqu'il était administré à des femmes enceintes et que cette administration permettait de réduire de façon significative la charge virale sanguine fœtale lorsque le fœtus était infecté par le CMVH (Jacquemard *et al.*, 2007). Sur la base de ces données encourageantes, une étude randomisée contre placebo évaluant l'efficacité du VCV dans l'infection materno-fœtale est en cours (PHRC : Cymeval, cymeval.org).

Les immunoglobulines hyper-immunes :

Des immunoglobulines anti-CMVH pourraient être utilisées dans le but de prévenir ou d'atténuer l'infection congénitale à CMVH : en effet le risque d'infection congénitale à CMVH symptomatique est plus important chez les femmes séronégatives (primo-infection) que chez les femmes séropositives (réinfection). Dans une étude préliminaire, l'administration d'Ig hyper-immunes avait permis d'observer une régression des signes échographiques chez des fœtus infectés et une proportion significativement plus élevée de nouveau-nés asymptomatiques dans le groupe traité (Nigro *et al.*, 2005). Ces données encourageantes doivent être confirmées par des études randomisées et une étude randomisée contre placebo va débiter en Italie.

6.2.1.2 Traitement du nouveau-né infecté

A ce jour, les indications du traitement des nouveau-nés infectés *in utero* sont restreintes aux nouveau-nés sévèrement atteints notamment ceux présentant une atteinte neurologique. En effet, une étude randomisée de phase II menée chez des nouveau-nés ayant une atteinte du système nerveux central avait permis de montrer qu'une cure de 6 semaines de GCV IV à raison de 12 mg/kg/jour permettait une amélioration ou une stabilisation de l'audition à 6 mois chez 81% (21/25) des enfants versus 59% (10/17) dans le bras contrôle (Kimberlin *et al.*, 2003). Cette efficacité s'associait toutefois à une proportion élevée de neutropénies (près de 2/3 des patients traités).

La mise sur le marché du Val-GCV pourrait modifier les indications du traitement néonatal et notamment d'étendre ces indications à des nouveau-nés moins sévèrement atteints dans le but de minimiser la survenue de séquelles neurologiques. Une étude pharmacologique récente a démontré que le traitement par du Val-GCV en suspension buvable à raison de 16 mg/kg/jour en 2 prises avait une bonne biodisponibilité chez le nouveau-né et ne se compliquait que rarement de neutropénie grave (Kimberlin *et al.*, 2008). A ce jour, quelques cas isolés de traitements plus ou moins prolongés par le Val-GCV de nouveau-nés infectés par le CMV ont été rapportés dans la littérature, mais ces cas ne permettent de conclure ni à l'absence de toxicité ni à l'efficacité de cette prise en charge (Galli *et al.*, 2007, Meine Jansen *et al.*, 2005, Muller *et al.*, 2008). Un essai randomisé qui vient de débiter aux USA va évaluer l'efficacité en terme de séquelles neurologiques et la tolérance d'un traitement prolongé de 6 mois par le Val-GCV (bras 1) par rapport à un traitement de 6 semaines (bras 2) chez des nouveaux-nés infectés symptomatiques. Les résultats de cette étude sont attendus pour 2014.

6.2.2. Traitement de l'infection à CMV chez les patients immunodéprimés

6.2.2.1 Au cours de l'infection par le VIH

L'infection à CMV survient à un stade avancé d'immunodépression, caractérisé par un nombre de lymphocytes T CD4+ inférieur à 100/mm³ et souvent voisin de 25/mm³. Avant l'ère des traitements antirétroviraux hautement actifs, 30 à 40 % des patients développaient une maladie à CMV au cours de l'évolution du SIDA. Ces traitements, mis en œuvre depuis 1996, conduisent à une reconstitution au moins partielle de l'immunité, ce qui a réduit de 80% l'incidence des rétinites à CMV. Les manifestations cliniques les plus fréquentes sont, par

ordre décroissant la chorioretinite (70 à 80%), les atteintes gastro-intestinales (10 à 15%), et les atteintes du système nerveux central (5 à 10%) (Salmon-Ceron, 2002).

La prophylaxie primaire chez les sujets ayant moins de 50 CD4+/mm³ n'est pas recommandée de façon systématique, mais ces patients doivent être alertés sur la nécessité de signaler tout troubles visuels et doivent bénéficier d'examen réguliers du fond d'œil (Yeni, 2008). Le traitement d'attaque de la rétinite à CMVH repose sur l'utilisation d'un antiviral par voie générale (GCV, Val-GCV, PFA ou CDV) associé ou non à des injections intravitréennes d'antiviral selon les modalités décrites ci-dessous. Le traitement d'entretien (prophylaxie secondaire) doit être effectué jusqu'à reconstitution immunitaire (nombre de lymphocytes T CD4+ > 100/mm³ depuis au moins 6 mois) (Lee *et al.*, 2006).

Le Val-GCV (900 mg/12h/21j) est la molécule la plus souvent utilisée en traitement d'attaque des rétinites à CMVH nouvellement diagnostiquées en remplacement du GCV IV. Le taux de réponses cliniques favorables à 4 semaines est de 77 %. Les autres molécules sont administrées en cas d'échec du traitement par GCV ou d'effets indésirables. Le CDV est administré à la dose de 5 mg/Kg une fois par semaine pendant 2 semaines puis 5 mg/Kg tous les 15 jours en traitement d'entretien. Le PFA est administré à la dose de 90 à 100 mg/Kg/12h pendant 2 à 3 semaines ou par injections intravitréennes à 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 PFA peut aussi être utilisé en association avec le GCV, à des doses de 100 mg/Kg/24h pour le PFA, et 10 mg/Kg/24h, pour le GCV.

Des injections intravitréennes de GCV peuvent être proposées. Elles doivent toujours être associées à un traitement par voie générale pour éviter la survenue d'une atteinte de l'œil controlatéral ou les manifestations extra-oculaires de l'infection.

Le traitement des autres atteintes (digestives ou système nerveux central) fait appel aux antiviraux systémiques aux posologies utilisées dans le traitement des rétinites.

6.2.2.2. Après transplantation d'organe, de moelle ou de cellules souches hématopoïétiques.

La sévérité des conséquences de ces infections à CMVH chez les receveurs d'allogreffe a entraîné l'élaboration de stratégies de prévention (Tableau 3).

Traitement préventif :

Le traitement préventif est administré selon deux modalités. Le traitement prophylactique vise à prévenir la survenue de l'infection à CMVH chez les receveurs les plus à risque tandis que le traitement anticipé (ou « *preemptive* ») tend à prévenir l'apparition de manifestations cliniques de maladie à CMVH chez un receveur qui a développé une infection active à CMVH.

➤ *Traitement prophylactique*

La prophylaxie est très largement utilisée et repose actuellement essentiellement sur l'utilisation du Val-GCV à raison de 450 mg/x2/jour ou du VCV à raison de 2 g/x4/jour mais aussi de l'ACV IV à raison de 5 mg/kg/x3/j notamment en greffe de moelle ou de l'utilisation de GCV à demi-dose dans certaines greffes d'organe à haut risque. Cette prophylaxie est préconisée pendant au moins 90 jours suivant la greffe notamment en transplantation d'organe.

La méta-analyse de plus de 34 études randomisées sur la prophylaxie de l'infection en transplantation a montré que la prophylaxie réduisait la mortalité globale de 40%, le risque de maladie à CMVH de 60% ainsi que le risque de survenue des infections à HSV et à VZV, des infections bactériennes et des infections fongiques (Hodson *et al.*, 2005). Ces bénéfices étaient constatés quel que soit l'organe greffé et quel que soit le statut sérologique du couple donneur/receveur.

Le VCV a montré son efficacité tant en transplantation rénale (Lowance *et al.*, 1999) qu'après greffe de moelle (Ljungman *et al.*, 2002). Le Val-GCV a montré une efficacité équivalente voire supérieure au GCV avec un nombre résiduel de cas de maladie à CMVH de 12,1% versus 15,2% à 6 mois et de 17,2% versus 18,4% à 12 mois, à l'exception des greffes hépatiques (Paya *et al.*, 2004). En transplantation pulmonaire, l'efficacité du Val-GCV a été trouvée identique à celle du GCV oral ou IV par comparaison à une cohorte rétrospective (Humar *et al.*, 2005). Une étude récente a démontré son utilité également dans la prise en charge des greffés rénaux séropositifs pour le CMVH quel que soit le statut du donneur (Weclawiak *et al.*, 2008). A ce jour, aucune étude n'a validé l'utilisation du Val-GCV en greffe de moelle.

Quelle que soit la molécule utilisée en prophylaxie, l'effet préventif est réversible à l'arrêt du traitement et les épisodes de maladie à CMVH apparaissent au-delà du 100ème jour après un rebond de réplication virale, justifiant une surveillance virologique prolongée.

➤ *Traitement anticipé (« preemptive »)*

Le traitement anticipé est entrepris lorsque le diagnostic d'infection active a été porté et que le niveau de réplication virale évalué par PCR ou par détection de l'antigénémie pp65 expose le receveur au risque de développer à court terme une maladie à CMVH. Il repose sur l'administration par voie intraveineuse de GCV à la dose de 5 mg/kg/12h ou de PFA à la dose de 90 mg/kg/12h, associé si possible à une modulation de l'immunosuppression. L'administration orale de Val-GCV, à la dose de 900 mg/12h a également démontré son efficacité dans ce type de prise en charge (Len *et al.*, 2008). Le seuil biologique d'antigénémie pp65 ou d'ADNémie à partir duquel initier le traitement varie en fonction du type de greffe, de la nature des traitements immunosuppresseurs et aussi de la technique utilisée au laboratoire pour le mesurer. Les techniques de biologie moléculaire en surveillance hebdomadaire permettent à ce jour une détection plus précoce et plus sensible de l'infection active à CMVH.

Le choix entre traitement prophylactique ou anticipé ne fait pas l'objet d'un consensus. Le traitement prophylactique prévient la survenue de la maladie à CMVH dans les 100 premiers jours après la greffe. En greffe d'organe, il représente la prévention de choix chez les patients à haut risque de maladie à CMVH (D+/R- et receveurs de poumon ou de greffe cœur-poumon). Cependant, l'utilisation d'une prophylaxie systématique pourrait générer le traitement par excès de patients à moindre risque. La prophylaxie retarde la maturation des défenses immunitaires anti-CMVH, en particulier le GCV. Elle retarde l'apparition des manifestations cliniques qui ont parfois une symptomatologie atypique, suggérant la nécessité de prolonger la prophylaxie au-delà de 100 jours, jusqu'à 24 semaines (Doyle *et al.*, 2006). Enfin elle augmente la durée d'exposition à l'antiviral, faisant craindre l'émergence de résistances. L'alternative, utilisée chez les receveurs d'organe séropositifs avant greffe, à moindre risque de maladie à CMVH, ou chez les receveurs de cellules souches hématopoïétiques en raison de la toxicité hématologique du GCV est le traitement anticipé. Celui-ci impose de définir les seuils d'antigénémie ou d'ADNémie pour initier le traitement dans chaque type de greffe, et nécessite une surveillance virologique étroite des patients. Du fait de traitements répétés par le même antiviral, il pourrait également être pourvoyeur de résistances.

Aucune des deux stratégies ne présente un avantage significatif en terme de coût. La prophylaxie est plus onéreuse sur le plan médicamenteux tandis que le traitement anticipé représente un surcoût biologique dû à la surveillance hebdomadaire de la charge virale ou de l'antigénémie pp65.

Traitement curatif

Le traitement antiviral spécifique dépend des manifestations cliniques. Il consiste en première intention en l'administration pendant 2 à 4 semaines de GCV IV (5mg/kg/12h), associée si possible à une diminution du traitement immunosuppresseur. Chez les receveurs de greffe de moelle, le traitement de la pneumopathie interstitielle associe le GCV IV à l'administration de gammaglobulines polyvalentes à 500 mg/kg. Dans certaines situations cliniques, des immunoglobulines spécifiques peuvent être préférables (150 mg/kg). L'efficacité de cette association est parfois controversée mais en l'absence d'étude randomisée ne démontrant pas de bénéfice, cette association est toujours d'usage (Boeckh *et al.*, 2009).

Suivant le type de maladie à CMVH 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 GCV peut être administré par voie intraveineuse (5 mg/kg/24h/7j ou 6 mg/kg/24h/5j).

Le Val-GCV est une alternative possible au GCV IV à la dose de 900 mg x 2/j pendant 3 semaines puis en entretien à 900 mg/j (Asberg *et al.*, 2007).

| | Molécules | Ganciclovir | Valganciclovir | Aciclovir | Valaciclovir | Foscarnet | Cidofovir | Ig polyvalentes |
|---|----------------------------------|--|---|--|--|--|---|--|
| | Nom commercial | Cymévan® | Rovalcyte® | Zovirax® | Zelitrex® | Foscavir® | Vistide® | Tégéline® |
| | Mode d'administration | IV * | Oral * | IV * | Oral * | IV * | IV | IV |
| Prophylaxie | Allogreffe d'organe | 5mg/kg/j (5 à 10 j si relais par Val-GCV sinon 3 mois) - D+/R- - R+ (cœur, poumon, cœur-poumon) | 900 mg/j (3 mois) - D+/R- | Non recommandé | 2gr x4/j (3 mois) - D+/R- à l'exception des greffes pulmonaires | Non | Non | Non |
| | Allogreffe de CSH | 5mg/kg/j (3 mois) patients à risque R+ | Non recommandé | 5mg/kg/x3/j (3 mois) - monitoring de la charge virale recommandé | 2gr x4/j (3 mois) - monitoring de la charge virale recommandé | | | |
| Traitement anticipé ≥ 2 semaines Monitoring de la charge virale hebdomadaire | Allogreffe d'organe | 5mg/kg/12h receveurs d'organe R+ | 900mg x2/j receveurs d'organe R+ Pour poumon et cœur-poumon, préférer la prophylaxie | Non | Non | 90mg/kg/12h - en cas de neutropénie ou de résistance au GCV | Non | Non |
| | Allogreffe de CSH | 5mg/kg/12h en 1 ^{ère} ligne ou en 2 ^e ligne après foscarnet | 900mg x2/j pourrait remplacer le GCV chez les patients à faible risque de maladie à CMV | | | 90mg/kg/12h - possible en 1 ^{ère} ligne - Combinaison GCV-PFA uniquement en 2 ^e ligne | | |
| Traitement curatif (Traitement d'entretien à ½ dose à discuter selon les localisations) | Allogreffe d'organe | 5mg/kg/12h 2-4 semaines | 900mg x2/j 2-4 semaines | Non | Non | 90mg/kg/12h (2-4 sem) en 2 ^e intention en cas de neutropénie ou de résistance au GCV | 5mg/kg/semaine pendant 2 semaines en 2 ^e intention en cas de neutropénie ou de résistance au GCV/PFA | 500mg/kg/j en association au GCV en traitement de la pneumonie à CMV après greffe de CSH |
| | Allogreffe de CSH | 5mg/kg/12h (4 sem) en 1 ^{ère} intention en cas de pneumonie à CMV | non recommandé | | | 90mg/kg/12h (2-4 sem) - possible en 1 ^{ère} ligne - combinaison GCV-PFA uniquement en 2 ^e ligne | 5mg/kg/semaine pendant 2 semaines en association avec le GCV en cas de pneumonie à CMV | |
| | Surveillance particulière | Numération Formule Sanguine | Numération Formule Sanguine | Non | Non | Fonction rénale | Fonction rénale | Non |

Tableau 3: Stratégies thérapeutiques pour la prise en charge des patients transplantés. *Table d'adaptation posologique selon la clairance de la créatinine. Ganciclovir : GCV ; Valganciclovir : Val-GCV ; Aciclovir : ACV ; Valaciclovir : VCV ; Foscarnet : PFA ; Cidofovir : CDV ; Immunoglobuline : Ig ; IV : IV : intraveineuse

6.3. Perspectives thérapeutiques

6.3.1. 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 CMVH : 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 son encapsidation. 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 *et al.*, 2002) (Komazin *et al.*, 2003) (Krosky *et al.*, 2003a) (Figure 14).

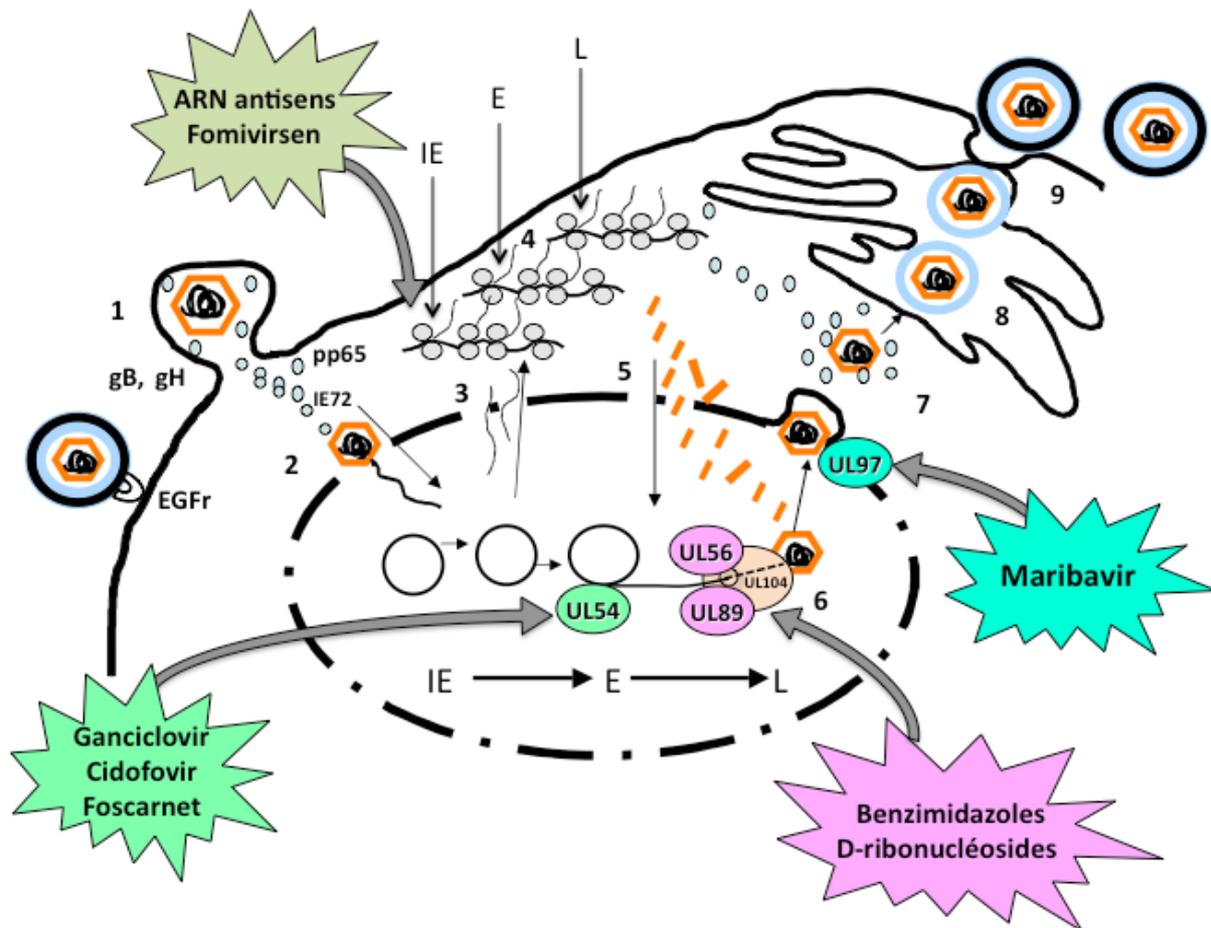


Figure 14 : Cycle viral et site d'action des antiviraux.

1 : Attachement du virion à un récepteur cellulaire, médié par la glycoprotéine B très rapidement suivi de la fusion de l'enveloppe avec la membrane cellulaire, dans laquelle interviennent les glycoprotéines gB et gH. 2 : Les protéines du tégment sont libérées dans le cytoplasme et migrent avec la capside vers le noyau. Puis la transcription et la traduction des gènes viraux se déroulent en trois phases coordonnées en cascade : très précoce ou Immediate Early (IE), précoce ou Early (E) et tardive ou Late (L). Le Fomivirsen est un oligonucléotide antisens complémentaire d'une séquence de 21 bases de l'ARNm IE2. 3 : La phase très précoce correspond à la synthèse des protéines très précoces qui bloquent le métabolisme cellulaire et stimulent la transcription des gènes viraux. 4 : La phase précoce correspond à la synthèse des protéines nécessaires à la réplication du génome, notamment l'ADN polymérase pUL54. S'ensuit la réplication du génome viral selon le modèle du cercle roulant. Cette étape est inhibée par des analogues nucléosidiques (ganciclovir, aciclovir, cidofovir) ou pyrophosphate (foscarnet). 5 et 6 : Phase tardive, synthèse de protéines structurales et encapsidation de l'ADN. 7 : Sortie des virions hors du noyau, résultant de modifications de la membrane nucléaire, intervention de la protéine pUL97, cible du maribavir. 8 : Acquisition du tégment et de l'enveloppe dans le cytoplasme. 9 : Sortie de la cellule.

6.3.1.1. 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 *et al.*, 1995), le Cl4RB (4,5,6-tetrachloro-1-(2,3,5-tri-O-acetyl- β -D-ribofuranosyl) benzimidazole) (Underwood *et al.*, 1998) et le CDMRB (2-chloro-5,6-dimethyl-(1- β -D-ribofuranosyl) benzimidazole) (Dittmer, 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 premières études ont révélé que les benzimidazoles D-ribonucléosides inhibaient très efficacement la réplication du CMVH mais les essais portant sur ces molécules ont été arrêtés du fait de leur faible biodisponibilité (Williams *et al.*, 2003). Aussi, différentes équipes cherchent-elles aujourd'hui à développer des dérivés plus stables du BDCRB et du TCRB (Kern *et al.*, 2005) (Nixon *et al.*, 2004). Les études se tournent également vers des dérivés quinolines C nucléosides (Chen *et al.*, 2003) ou des dérivés imidazoles nucléosides polyhalogénés (Chien, 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 cytomégalovirus multi-résistantes aux drogues classiques et pourraient constituer une alternative intéressante en thérapeutique. 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 *et al.*, 2003).

6.3.1.2. 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 *et al.*, 1999, Evers *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 CMVH. Il inhibe le transit extranucléaire des capsides ou *nuclear egress* et indirectement la synthèse d'ADN viral par blocage de la phosphorylation par UL97 de la protéine accessoire UL44 de la polymérase virale UL54 (Krosky *et al.*, 2003a). Le maribavir est également un inhibiteur sélectif de la phosphotransférase BGLF4 du virus d'Epstein-Barr impliquant un mécanisme encore obscur (Gershburg *et al.*, 2004). La protéine pUL27 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 *et al.*, 2003) (Chou *et al.*, 2004).

Le MBV inhibe *in vitro* la répllication des souches de CMVH à des concentrations 7 à 10 fois inférieures à celles du GCV (Koszalka *et al.*, 2002) et est actif sur les souches résistantes aux GCV, CDV et/ou PFA. Il a une biodisponibilité de 30 à 40% après administration orale. L'administration de MBV modifie l'aspect de l'effet cytopathique du CMVH en culture cellulaire : les cellules présentent des inclusions intranucléaires de grande taille réfringentes donnant un aspect de billes (Chou, 2008) (Figure 15). Cet ECP est similaire à celui observé dans des cultures de souches de CMVH déficientes pour pUL97 ce qui confirme que le MBV est actif par inhibition de pUL97.

Les premiers essais cliniques n'ont pas montré de toxicité hématologique ou rénale quelque soit la dose utilisée. Une réduction de la charge virale CMVH dans le sperme, dose et durée dépendante, a été démontrée chez des patients séropositifs pour le VIH (Lalezari *et al.*, 2002). En prophylaxie chez des receveurs de greffe de moelle, malgré les résultats satisfaisants d'une étude de phase II comparant le MBV à un placebo (Winston *et al.*, 2008), un essai de phase III comparant le MBV au GCV a été interrompu en raison d'une efficacité insuffisante. Un autre essai de phase III comparant le MBV au GCV oral en prophylaxie chez les transplantés hépatiques est en cours d'analyse.

De nouvelles études sont donc nécessaires pour définir la place éventuelle du MBV dans la prévention et le traitement des infections à CMVH.

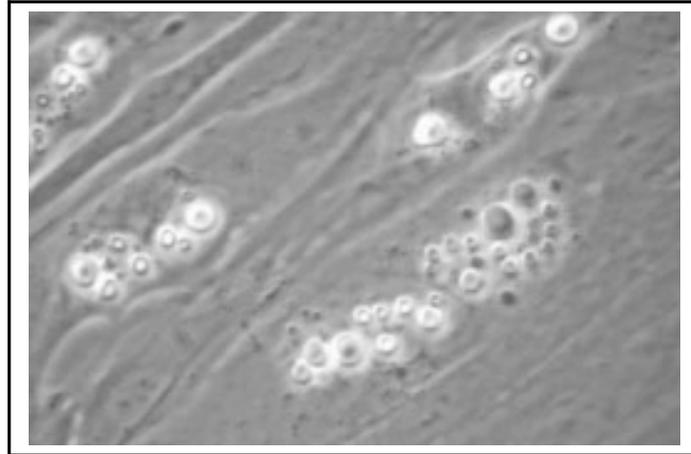


Figure 15: Effet cytopathique de CMVH caractéristique de l'inhibition de pUL97 par le MBV. Isolat clinique de CMVH en culture sur monocouche de cellules fibroblastiques sous 5 μ M de MBV. Au fur et à mesure de la progression de l'ECP se forment des inclusions intranucléaires de grande taille réfringentes. D'après (Chou, 2008).

6.3.1.3. Artésunate

Un traitement antipaludéen, l'artésunate, a montré une activité antivirale *in vitro* contre des souches de CMVH sauvages et résistantes au GCV (Kaptein *et al.*, 2006). Le mécanisme d'action n'est pas encore complètement élucidé mais il semblerait que l'artésunate agisse sur la voie NF- κ B. Très récemment, Shapira et coll. ont rapporté pour la première fois le traitement d'un receveur de moelle présentant une infection avec une souche de CMVH résistante au GCV et au PFA (Shapira *et al.*, 2008). Après 7 jours d'artésunate, une diminution significative de la charge virale a été observée. Actuellement, l'artésunate est en cours d'essai clinique de phase III en traitement anticipé chez les receveurs de moelle (NCT00284687).

6.3.2. Prophylaxie : vaccin CMVH

Les vaccins en cours de développement reposent, soit sur des souches virales modifiées, recombinantes et atténuées dans leur pouvoir pathogène, stimulant les réponses globales contre le virus, soit sur des combinaisons de glycoprotéines virales, incluant la glycoprotéine B, cible majeure des anticorps neutralisants, introduites dans différents vecteurs supposés stimuler à la fois le système immunitaire humoral et cellulaire (Schleiss, 2005).

6.3.2.1. Vaccins vivants atténués

Les premiers essais de vaccination ont été conduits avec un vaccin vivant atténué obtenu à partir de la souche Towne. Ce vaccin n'a pas permis d'obtenir une protection significative bien que l'on ait retrouvé dans le sérum des volontaires (jeunes femmes séronégatives) des anticorps neutralisants et une réponse cellulaire (Adler *et al.*, 1998). La souche Towne serait trop atténuée.

Une autre solution a alors été développée. Elle consistait en la fabrication d'une chimère possédant les caractéristiques de Toledo et l'atténuation de la souche Towne. Cette souche recombinante a montré une bonne tolérance et permet d'espérer une amélioration de l'immunogénicité par rapport à la seule souche Towne (Heineman *et al.*, 2006).

6.3.2.2. Vaccins protéiques

Une dernière approche a été de construire des vaccins sous unitaires à partir de protéines recombinantes. La glycoprotéine B, cible majeur des anticorps neutralisants, semble être la protéine la plus prometteuse. En effet l'administration du mélange entre la gB recombinante et un adjuvant tel l'alumine a montré une excellente tolérance et a permis d'obtenir avec un schéma en trois injections (0,1 et 6 mois) un taux d'anticorps neutralisants équivalent à celui obtenu avec une infection naturelle (Frey *et al.*, 1999). Ces résultats ont été retrouvés notamment chez les jeunes enfants (Mitchell *et al.*, 2002).

Récemment et pour la première fois, des résultats encourageants ont été obtenus lors d'un essai randomisé évaluant un vaccin contenant une glycoprotéine B d'enveloppe recombinante (Pass *et al.*, 2009). Dans cet essai, 464 femmes séronégatives pour le CMVH ont été incluses : 230 dans le bras placebo et 234 dans le bras vaccinal. A un an, 49 primo-infections avaient eu lieu: 18 dans le groupe des vaccinées et 31 dans le groupe placebo, l'efficacité du vaccin était de 50%. D'autres études vaccinales sont en cours avec des résultats prévus dans les deux ans.

7. Résistance aux antiviraux

7.1. Epidémiologie de la résistance

La résistance du CMVH aux antiviraux a été largement étudiée chez les patients infectés par le VIH. Avant l'ère des traitements antirétroviraux hautement actifs, l'incidence de la résistance était élevée : la résistance au GCV était évaluée à environ 7 % après 3 mois de traitement et 27% après 12 mois et la résistance au PFA passait de 9% après 3 mois de traitement à 37% après 12 mois dans deux études (Whitley *et al.*, 1998) (Weinberg *et al.*, 2003). Depuis 1996, date de l'introduction des trithérapies antirétrovirales, l'incidence de la résistance au GCV, chez des patients traités pour rétinite, a diminué des deux-tiers (Martin *et al.*, 2007) : ainsi l'incidence de la résistance au Val-GCV était de 2% après 3 mois de traitement et de 13% après 12 mois selon l'étude de Boivin et coll (Boivin *et al.*, 2001).

Chez les receveurs d'organe solide, l'incidence de la résistance au GCV varie entre 0,28 à 9% selon les études (Limaye *et al.*, 2000) (Li *et al.*, 2007) (Eid *et al.*, 2008) et peut atteindre 27% chez les receveurs de transplantation pulmonaire, séronégatifs avant greffe, dans l'étude de Limaye et coll (Limaye, 2002). Chez les receveurs d'allogreffe de moelle, les études de prévalence de la résistance au GCV sont encore peu nombreuses.

7.2. Facteurs favorisant l'émergence de la résistance

Les facteurs qui favorisent l'émergence de la résistance sont une exposition prolongée aux antiviraux, des doses sub-optimales, un haut niveau de réplication virale et l'induction d'une immunosuppression intense. Ces conditions sont réunies chez les receveurs d'organe au cours de la primo-infection, tout particulièrement chez les receveurs de greffe pulmonaire de greffe rein-pancréas. Après allogreffe de cellules souches hématopoïétiques, les receveurs séropositifs sont les plus à risque, ce d'autant qu'ils reçoivent une greffe de sang de cordon. En pratique, on doit suspecter l'émergence d'une résistance au GCV chez des sujets :

1) qui ont reçu à un moment ou à un autre un traitement cumulé de plus de 30 jours avec du GCV ou du Val-GCV ou avec des traitements itératifs par plusieurs antiviraux

2) chez qui l'on constate une augmentation de la charge virale alors qu'ils sont traités efficacement depuis plus de 2 semaines pour l'épisode infectieux à CMVH actuel, ou une persistance de charge virale détectable parfois à faible niveau pendant plus de trois semaines sous traitement.

Avant de demander la recherche d'une résistance au GCV, il faut s'assurer que la dose utilisée de GCV ou de Val-GCV est correcte sur un plan pharmacocinétique en vérifiant la concentration plasmatique résiduelle d'ACV (qui doit être comprise entre 0,5 et 1 mg/l) ou de GCV (comprise entre 0,5 et 8mg/L).

7.3. Mécanismes moléculaires de la résistance aux antiviraux

La résistance est due à l'apparition de mutations sur les gènes codant les enzymes nécessaires aux mécanismes d'action des antiviraux : la protéine kinase UL97 et l'ADN polymérase virale UL54.

Le GCV étant la seule molécule nécessitant une primo-phosphorylation par la kinase UL97 pour être active sur la polymérase virale UL54, les mutations apparaissant au niveau de *UL97* sont responsables de résistance au GCV. Elles sont les premières à apparaître sous pression de sélection par le GCV et conduisent à un bas niveau de résistance. Lors des traitements prolongés par le GCV, des mutations de *UL54* s'ajoutent aux mutations de *UL97*, ce qui confère un haut niveau de résistance au GCV et une résistance croisée au CDV. Deux études récentes décrivent l'émergence de mutations de résistance après prophylaxie ou traitement par Val-GCV (Eid *et al.*, 2008) (Boutolleau *et al.*, 2009).

Lors de traitements par le CDV ou le PFA, les mutations de résistance sont localisées sur le gène *UL54*. Les mutations de *UL54* induisent, en fonction de leur localisation sur le gène, une résistance à un, deux ou aux trois antiviraux (Gilbert *et al.*, 2005).

Les mutations de *UL97*, responsables de la résistance au GCV, induisent la résistance au ACV, l'ACV étant également primophosphorylé par la kinase UL97 pour être actif. L'émergence rapide de la résistance au GCV après traitement prophylactique par le VCV a été démontrée chez un receveur de greffe de rein (Alain *et al.*, 2004) (Hantz *et al.*, 2005).

7.4. Détection de la résistance

Devant un contexte de résistance clinique à un traitement antiviral, il est recommandé d'effectuer une recherche de résistance. Deux approches peuvent être envisagées : phénotypique et génotypique.

7.4.1. Approche phénotypique

Le diagnostic phénotypique de résistance repose sur la mesure de la concentration d'un antiviral inhibant de 50 à 90% la réplication d'une souche de CMVH en culture. Différents paramètres peuvent être utilisés pour apprécier la réduction de la réplication en présence de concentrations croissantes de l'antiviral : le nombre de plages (en 14 jours) ou de foyers d'effet cytopathique révélés en immunocytochimie (en 6 jours), le nombre de cellules exprimant des antigènes tardifs, révélées par immunoperoxydase indirecte ou cytométrie de flux, la production d'antigènes tardifs révélée par ELISA, ou la synthèse de l'ADN viral mesurée à l'aide de techniques d'hybridation ou de PCR en temps réel (Schnepf *et al.*, 2009). L'inoculum, qui doit être standardisé, consiste en un stock de virus extracellulaire obtenu en 5 à 10 passages après l'isolement initial, ce qui nécessite un délai minimum de 4 à 6, voire 10 semaines avant l'obtention d'un titre viral suffisant ou, pour réduire ce délai, en un stock de cellules infectées, ce qui restreint le nombre de passages nécessaires en culture cellulaire. Le test peut être pratiqué directement à partir du prélèvement (urine, lavage broncho-alvéolaire, leucocytes) sans isolement préalable. Les limites à la pratique de ce test rapide sont le titre infectieux insuffisant et la cytotoxicité éventuelle du prélèvement. Ces techniques ont l'avantage d'être très sensibles et de permettre d'évaluer la capacité répliquative 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). Pour pallier ce problème, on détermine 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. La comparaison des valeurs obtenues pour les souches isolées avant, en cours et après traitement est très utile à l'interprétation des résultats. Les isolats constitués de mélanges hétérogènes de souches sensibles et résistantes sont source de difficulté d'interprétation car la présence de souches résistantes minoritaires peut alors être méconnue (Alain *et al.*, 1997) (Emery *et al.*, 2000). L'interprétation des résultats doit également tenir compte de l'origine de la souche testée qui, le plus souvent, est isolée du sang ou des urines, et peut donc différer de la souche responsable des manifestations cliniques de la maladie à CMVH, rétinite ou encéphalite par exemple (Boivin *et al.*, 1997).

7.4.2. Approche génotypique

L'approche génotypique consiste à rechercher les mutations de résistance par analyse de la séquence nucléotidique des gènes *UL97* et *UL54*. Elle s'effectue à partir de l'ADN extrait de la culture cellulaire après isolement de la souche ou directement à partir du prélèvement. Des mutations de *UL97* ont ainsi été détectées dans le plasma et le LCR [24]. Des méthodes rapides par analyse de produits d'amplification après coupure par des enzymes de restriction ont été développées pour la détection des mutations les plus fréquentes (460, 520, 594 et 595) de *UL97* (Chou *et al.*, 1995). Des méthodes de PCR en temps réel sélectives sont disponibles pour la détection des mutations 594, 595, 603 et 607 (Gohring *et al.*, 2008). Ces méthodes rapides permettent d'identifier un mutant dans un isolat mixte si l'ADN muté représente 10 % au moins de l'ADN total analysé. Des méthodes basées sur une PCR suivi d'un séquençage de l'intégralité des gènes d'intérêt (*UL97* et *UL54*) ont également été développées et permettent, contrairement aux techniques précédentes, de déterminer le polymorphisme de la souche. Applicables directement aux prélèvements pathologiques sans isolement préalable, ces techniques génotypiques ont pour avantage de réduire fortement les délais d'analyse et de permettre une bonne standardisation des essais. Elles ont cependant pour inconvénient de ne donner aucune information sur la capacité répliquative et le 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. Parallèlement, d'autres approches ont été développées pour mesurer l'impact d'une mutation nouvelle sur la résistance. L'une d'entre-elles repose sur un modèle enzymatique *in vitro* utilisant un vecteur vaccine recombinant porteur de la protéine *UL97* permettant l'insertion de toute nouvelle mutation. Ce vecteur permet ainsi d'évaluer les capacités de pUL97 à phosphoryler le GCV *in vitro* (Michel *et al.*, 1996). Une étude de l'impact des mutations *in silico* est également envisageable grâce à des modèles théoriques basés sur la prédiction de structure de la protéine cible à l'aide d'homologues structuraux. Au sein du laboratoire, un précédent travail a permis de mieux comprendre l'impact de certaines mutations de pUL97 situés à proximité du site de fixation de l'ATP sur la résistance au GCV (Figure 16).

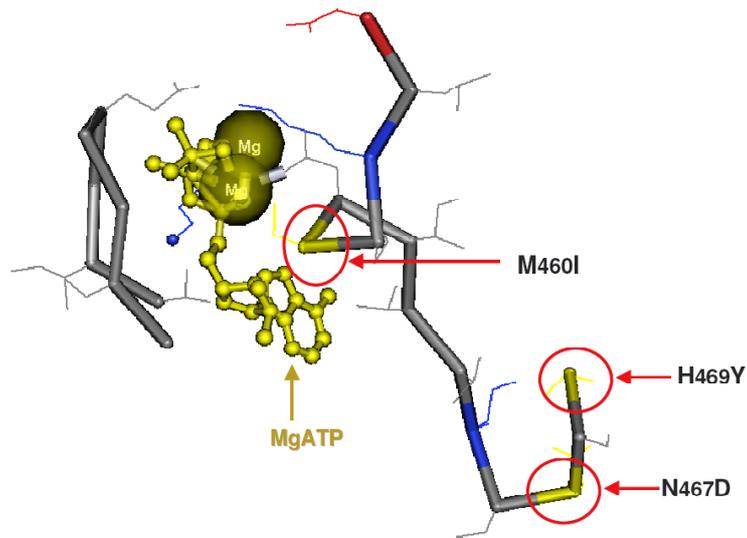


Figure 16: Prédiction de la structure du site catalytique de pUL97 par comparaison avec la famille des S-Tkc kinases à l'aide du logiciel Cn3D (Conserved Domains search, NCBI). Elle confirme le rôle primordial dans la résistance des mutations portant sur la méthionine 460 du site de fixation à l'ATP, ici M460I conférant une résistance au ganciclovir. La position éloignée des acides aminés 469 et 467 rend peu probable la survenue de résistance par mutations sur ces positions (données non publiées)

8. Les principales cibles antivirales

8.1. La protéine kinase pUL97

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 *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 *et al.*, 1989). 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 *et al.*, 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 cadres ouverts de lecture (ORF : *Open Reading Frame*) HSRF3 (CMVH) et 15R (HHV6), homologues des gènes *UL13*, *VZV47* et *BGLF4* (Chee *et al.*, 1989). L'ensemble de ces résultats est à l'origine de la découverte de la kinase pUL97, mais son implication dans la primo-phosphorylation du GCV ne sera réellement démontrée qu'en 1992 par Littler et Sullivan (Littler *et al.*, 1992).

Bien que la kinase pUL97 présente des aspects structuraux particuliers et des activités variées, elle partage un certain nombre de caractéristiques avec ses homologues des autres herpèsvirus. Toutes ces kinases ont en commun de nombreux acides aminés mais l'identité limitée des séquences suggère que leurs fonctions ont divergé tôt dans l'évolution de ces virus (Michel *et al.*, 2004). Même si aucune de ces enzymes n'est essentielle pour la réplication, les virus recombinants déficients pour pUL97 ont une capacité répllicative réduite dans certaines lignées cellulaires (Prichard *et al.*, 1999). Cela a également été démontré pour d'autres homologues (*UL13*, *VZV47*), ce qui suggère que l'ensemble de ces homologues joue un rôle important dans le cycle réplcatif des herpèsvirus (Romaker *et al.*, 2006).

Quelques caractéristiques communes de ces protéines kinases commencent à émerger, notamment l'autophosphorylation, qui existe pour l'ensemble de ces kinases et qui est présumée être impliquée dans la régulation de leur activité (He *et al.*, 1997). Ces protéines

virales ont également des cibles communes, en particulier les facteurs de processivité (ou protéine accessoire) de l'ADN polymérase. Toutefois, d'autres cibles ne sont communes qu'à 2 ou 3 kinases virales : HSV UL13, EBV BGLF4 et CMVH UL97 ont pour cible des protéines cellulaires habituellement phosphorylées par la cdk1 telle que le facteur d'élongation 1 delta (EF-1 δ) (Kawaguchi *et al.*, 1999) tandis que le domaine carboxy-terminal de l'ARN polymérase II n'est phosphorylé que par UL13 et UL97 (Long *et al.*, 1999) (Baek *et al.*, 2004). L'histone H2B peut également être phosphorylée par la plupart de ces kinases mais la signification biologique de ce phénomène reste peu claire.

En dépit de leurs activités biologiques communes, ces kinases ont chacune acquis leur fonction propre ce qui a été très bien démontré par l'absence de complémentation entre chacune d'elles. En effet, les expériences de complémentation entre UL13 et UL97 (Ng *et al.*, 1996) voire même entre deux kinases plus proches telles que UL97 du CMVH et M97 du CMV murin (Wagner *et al.*, 2000) n'ont pas permis de mettre en évidence une restauration complète de la capacité répliquative avec persistance d'une croissance déficiente en culture cellulaire.

8.1.1. Caractéristiques et domaines fonctionnels de pUL97

La kinase pUL97 est une protéine de 707 acides aminés (aa), codée 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 6 transcrits ARN de haut poids moléculaire ayant en commun leur extrémité 3' correspondant à la séquence du gène *UL99* (Wing *et al.*, 1995). Cette unité transcriptionnelle est largement conservée chez tous les herpèsvirus. La kinase pUL97 s'exprime lors de la phase précoce ou précoce-tardive de la répliquaison virale. Elle a été décrite parmi les protéines du tégument au sein de la particule virale constituée (Kalejta, 2008). Sa localisation intracellulaire au cours de l'infection est principalement intranucléaire avec un discret marquage périnucléaire à la phase tardive de l'infection (Michel *et al.*, 1996).

La structure générale de cette protéine de 78 kDa n'est toujours pas connue mais de nombreuses études ont permis de mettre en évidence un domaine de régulation au sein de la région N-terminale et un domaine catalytique dans la région C-terminale. La partie N-terminale de la protéine n'est pas impliquée dans l'activité enzymatique. Cependant, elle n'en demeure pas moins essentielle dans la mesure où elle porte des signaux de localisation nucléaire (NLS) entre les acides aminés 48 et 110 (Michel *et al.*, 1998). Ce domaine de régulation comporte également un domaine conservé de liaison à la protéine du

rétinoblastome. Sa suppression affecte l'inactivation du suppresseur de tumeur dans les cellules infectées (Prichard *et al.*, 2008) et plus modestement la sensibilité au MBV (Gill *et al.*, 2009).

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 *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 *et al.*, 1989) puis de l'HHV6 et du CMVH (Chee *et al.*, 1989) (Figure 17).

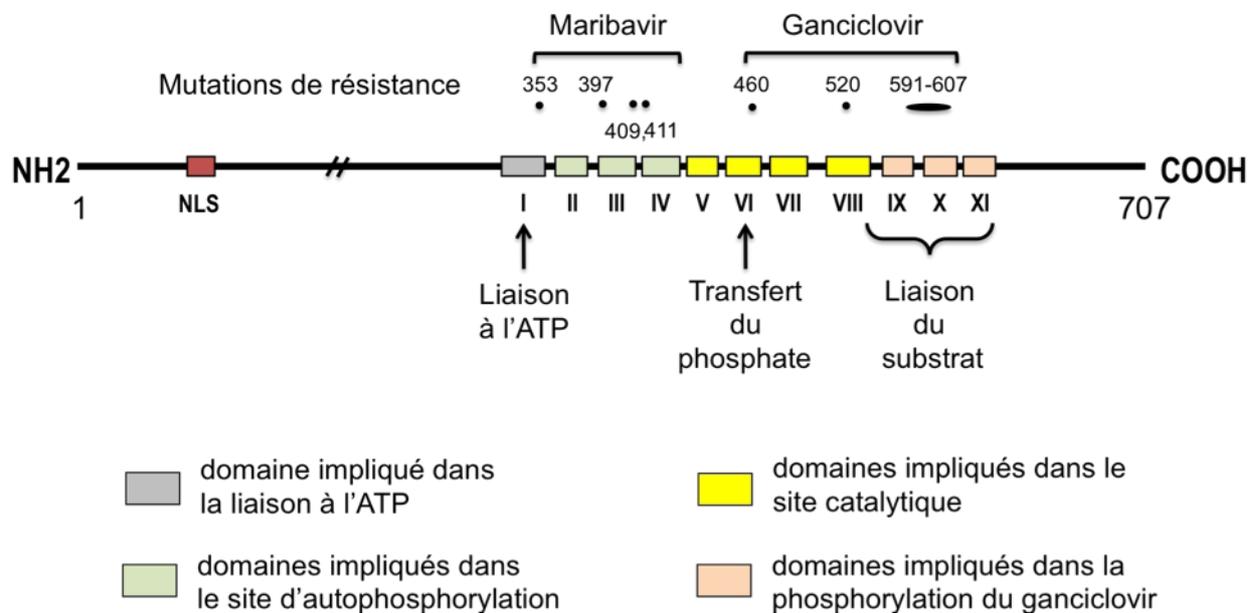


Figure 17: Principaux domaines et régions fonctionnelles de pUL97 avec la localisation des principales mutations responsables de résistance au ganciclovir et au maribavir. (NLS : Nuclear Localization Signal)

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, $_{338}GQGSFG_{343}$ pour la kinase pUL97. Ce motif hautement conservé constituerait un site de liaison aux nucléotides et plus particulièrement à l'ATP (contact avec le ribose et le pyrophosphate) dont l'hydrolyse fournit l'énergie et le phosphate nécessaire à la phosphorylation. 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 *et al.*, 1998). 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 *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'analyse de l'impact de la perte de ces différents acides aminés évaluée *in vitro*, par mesure du niveau de phosphorylation du ganciclovir, a montré que 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 (K355 pour pUL97) généralement encadré d'une région riche en acides aminés hydrophobes et situé 12 acides aminés 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 (He *et al.*, 1997). 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 *et al.*, 1986).

Les domaines conservés III, IV et V n'ont pas de rôle connu. Seul un résidu glutamate est conservé en position 379 (pour pUL97) dans le domaine III.

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). Les résidus invariants D et N interagissent avec le γ -phosphate et le Mg^{2+} du complexe MgATP (Hanks *et al.*, 1988). Ce sous-domaine contient la M460, position décrite comme impliquée dans la résistance au GCV.

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), où l'aspartate serait impliqué dans l'interaction avec l'ATP via les ponts de Mg²⁺.

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. L'histidine en position 520 est un site de mutation de résistance au GCV.

Le domaine conservé IX contient une séquence consensus DXXXXG, ₅₇₄DEV₅₈₀RMG₅₈₀ 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 *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 associé à 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.

La conservation des différents domaines de la région catalytique de la kinase pUL97 entre les différents homologues a permis de mieux comprendre le fonctionnement de cette enzyme mais l'absence d'une structure cristallisée demeure une étape critique pour le développement de nouveaux inhibiteurs.

8.1.2. Fonctions

La fonction naturelle d'une kinase est par essence la phosphorylation d'un substrat. De nombreuses études ont permis de mettre en évidence un grand nombre de substrats naturels de

pUL97, suggérant ainsi une implication dans différentes fonctions et donc un rôle central au cours de la réplication virale (Figure 18). Mais, contrairement à ses homologues chez les autres herpèsvirus, pUL97 n'intervient pas dans la régulation de l'expression des gènes viraux. La kinase pUL97 présente également la particularité de phosphoryler des analogues nucléosidiques synthétiques. Cette activité apparaît comme une fonction secondaire de cette enzyme, puisqu'elle ne phosphoryle pas les nucléosides naturels (Michel *et al.*, 1998).

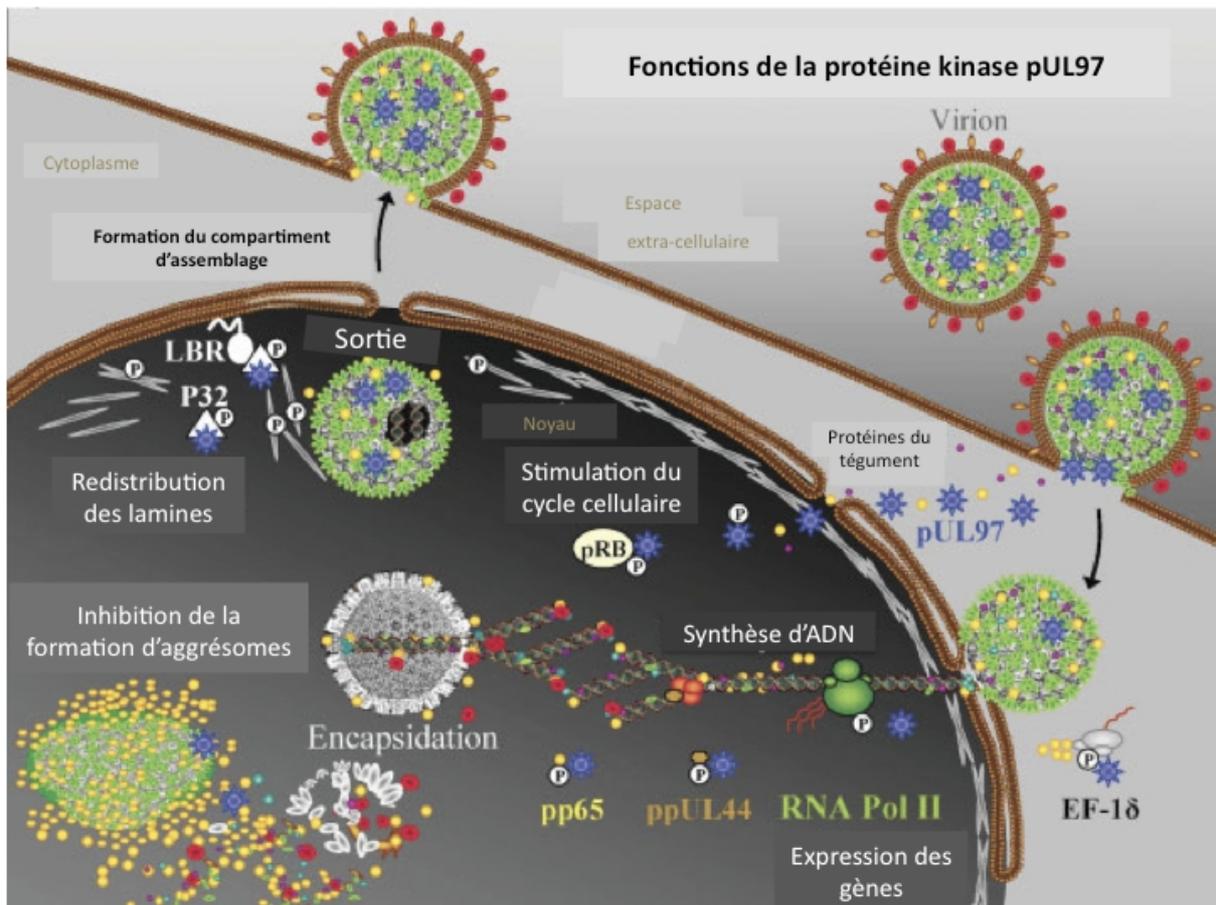


Figure 18 : Fonctions de la protéine kinase pUL97 au cours de la réplication virale.

Après fusion de la particule virale avec la membrane cellulaire, les protéines du tégment dont pUL97 sont relarguées dans la cellule hôte. Une fois exprimée, la kinase pUL97 va alors phosphoryler des protéines virales tel que pUL44 et pp65 ainsi que des protéines cellulaires. La phosphorylation de pRb stimule le cycle cellulaire et active la synthèse d'enzymes cellulaires qui vont faciliter la réplication de l'ADN viral. La phosphorylation de l'ARN polymérase II contribue également à activer l'expression de gènes viraux. La kinase pUL97 est également impliquée dans la morphogénèse du virion en inhibant la formation d'aggrégats nucléaires qui séquestrent un grand nombre de protéines structurales. Elle participe à la redistribution des lamines nucléaires pour faciliter la sortie de la capsid du noyau et affecte probablement la formation du compartiment d'assemblage dans le cytoplasme. D'après (Prichard, 2009).

La phosphorylation des résidus sérine dans certains substrats peptidiques dépendrait de la présence d'un résidu lysine ou arginine localisé 5 acides aminés en amont de la sérine (Baek *et al.*, 2002b), mais il n'est pas indispensable et la définition d'un site consensus demeure difficile à définir (Baek *et al.*, 2004). Ainsi, la spécificité de la kinase serait plutôt influencée par la proximité du substrat, médiée par des interactions physiques comme cela a été démontré pour d'autres protéines kinases (Remenyi *et al.*, 2006).

Les substrats de pUL97 sont nombreux, d'origine virale ou cellulaire. La kinase pUL97 est son propre substrat et s'autophosphoryle sur les résidus sérine 2, 3, 11, 13, 133 et thréonine 16, 18, 134 et 177 (Baek *et al.*, 2002a). 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 *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. 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 *et al.*, 2003b) (Marschall *et al.*, 2003). L'étude de Marschall et coll., 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. 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. La protéine du tégment pp65 est également phosphorylée et forme un complexe avec la kinase pUL97 (Kamil *et al.*, 2007). Ce rôle de pUL97 est également essentiel puisque l'inactivation de celle-ci entraîne un défaut de phosphorylation de pp65 ce qui conduit à une production importante d'agrégats nucléaires dans les cellules infectées (Prichard *et al.*, 2005). Ceci a pour conséquence une tégmentation 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. 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.

De nombreuses cibles cellulaires ont été décrites en tant que substrats naturels de pUL97. Un certain nombre sont également des substrats de la kinase cellulaire cdk1, telles que l'ARN polymérase II (Baek *et al.*, 2004) et EF-1 δ (*eukaryotic elongation factor Idelta*) (Kawaguchi *et al.*, 1999). Cependant, le rôle de pUL97 dans la phosphorylation de ces substrats demeure assez flou. Plus récemment, Marschall *et coll.* ont démontré l'interaction de pUL97 avec la protéine cellulaire p32 (Marschall *et al.*, 2005). La formation d'un complexe avec la protéine pUL97 conduit à la phosphorylation de p32. Cette protéine étant 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 kinase pUL97, se retrouvant 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. Cependant, la dislocation de la lamina seule ne suffit pas à permettre la sortie du noyau des capsides néoformées, la protéine pp65 ayant également un rôle dans cette étape comme nous l'avons vu précédemment. Une autre cible cellulaire de pUL97 décrite plus récemment est la protéine du rétinoblastome (pRb), qui est retrouvée hyperphosphorylée dans les cellules infectées (Jault *et al.*, 1995). Trois domaines de liaison à pRb ont été décrits au sein de pUL97 dont l'un de type LxCxE en position amino-terminal semble très conservé au sein des herpèsvirus (Prichard *et al.*, 2008). La phosphorylation de pRb bloque la régulation négative de pRb sur le facteur de transcription E2F. L'activation de E2F favorise la synthèse de facteurs de transcription impliqués dans la synthèse d'ADN, la régulation du cycle cellulaire, de la mitose et de l'apoptose (Prichard, 2009). Cette activité est très importante car de nombreux événements du cycle cellulaire sont régulés par pRb et l'on peut rapprocher l'activité de la kinase pUL97 de celles de divers oncogènes viraux tel que E1A d'adénovirus, E7 de papillomavirus et l'antigène T de SV40. Cette hypothèse reste encore à explorer. Il est encore trop tôt pour savoir si pUL97 pourrait avoir un rôle dans la prolifération virale.

La protéine kinase pUL97 intervient ainsi dans la réplication virale à différents niveaux. 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 néoformées, d'une part en déclenchant, via la protéine cellulaire p32, la dislocation de la lamina, et d'autre part en inhibant la tégumentation intranucléaire, via la

phosphorylation de pp65. Enfin, son interaction avec pRb semble l'impliquer dans des phénomènes de régulation encore plus complexes intervenant dans le rapport virus-cellule. Ainsi, le rôle central de pUL97, à différents niveaux du cycle viral, explique-il l'expression précoce ou précoce-tardive du gène *UL97*. L'inhibition de cette protéine par des molécules telles que le MBV représente donc une voie prometteuse dans la stratégie thérapeutique menée contre le CMVH puisqu'elle pourrait impacter considérablement l'évolution clinique de la maladie.

8.1.3. pUL97 et résistance

La phosphorylation du GCV par la kinase pUL97 constituant l'étape limitante de l'activation du GCV, pUL97 représente la première cible de mutations de résistance au GCV. Au sein du gène *UL97*, les codons 460, 520 et 590-607 ont été répertoriés comme étant le site de mutations de résistance au GCV (Chou *et al.*, 2002). Le codon 460 est localisé dans le domaine VIb du site catalytique et serait impliqué dans le transfert du phosphate. La fonction du domaine VIII dans lequel se situe le codon 520 n'est pas bien définie à ce jour. Le domaine comprenant les codons 591-607 n'est pas indispensable à la réplication et de ce fait est probablement impliqué dans la reconnaissance du GCV en tant que substrat. L'ensemble des mutations de résistance actuellement décrites est répertorié dans le Tableau 4.

Ces mutations sont responsables d'une diminution de la capacité de phosphorylation du GCV et ont été confirmées expérimentalement par transfert de marqueur. Cependant, les mutants *UL97* résistants au GCV n'ont pas l'ECP anormal observé avec les souches déficientes en pUL97 et ont une croissance subnormale en culture cellulaire, suggérant que la liaison et la phosphorylation des substrats naturels demeurent intactes.

| Codon | Acides aminés | | Mutant/sauvage | Références |
|------------------------------|---------------|--------|----------------|----------------------------------|
| | Sauvage | Mutant | GCV IS50 | |
| Mutations ponctuelles | | | | |
| 460 | M | I | 5 | (Lurain <i>et al.</i> , 1994) |
| 460 | M | V | 8.3 | (Chou <i>et al.</i> , 2005) |
| 520 | H | Q | 10 | (Hanson <i>et al.</i> , 1995) |
| 591 | A | V | 1.3 | (Chou <i>et al.</i> , 2002) |
| 592 | C | G | 2.9 | (Chou <i>et al.</i> , 2005) |
| 594 | A | G | 14 | (Bourgeois <i>et al.</i> , 1997) |
| 594 | A | T | 2.7 | (Chou <i>et al.</i> , 2002) |
| 594 | A | V | 8.3 | (Chou <i>et al.</i> , 2005) |
| 595 | L | F | 16 | (Wolf <i>et al.</i> , 1995) |
| 595 | L | S | 9.2 | (Chou <i>et al.</i> , 2005) |
| 595 | L | W | 5.1 | (Chou <i>et al.</i> , 2002) |
| 596 | E | G | 2.3 | (Chou <i>et al.</i> , 2002) |
| 599 | K | T | 5.3 | (Khan <i>et al.</i> , 1998) |
| 603 | C | W | 8 | (Chou <i>et al.</i> , 1997) |
| 607 | C | F | 1.9 | (Chou <i>et al.</i> , 2002) |
| 607 | C | Y | 13 | (Baldanti <i>et al.</i> , 1998) |
| Délétions | | | | |
| 590–593 | | | 3–10 | (Sullivan <i>et al.</i> , 1992) |
| 595 | | | 13 | (Baldanti <i>et al.</i> , 1995) |
| 595–603 | | | 8.4 | (Chou <i>et al.</i> , 2000a) |
| 600 | | | 1.9 | (Chou <i>et al.</i> , 2002) |
| 601–603 | | | 15 | (Marfori <i>et al.</i> , 2007) |

Tableau 4: Récapitulatif des différentes mutations de pUL97 conférant une augmentation de la CI50 après transfert à une souche sauvage. IS50 (index de sensibilité 50%). CI50 (concentration inhibitrice 50%). ISS50 = CI50 souche / CI50 AD169

La kinase pUL97 est également la cible du MBV. Cependant le nombre de patients traités par MBV à ce jour est encore assez faible et aucune mutation de résistance dans un isolat clinique n'a été publiée dans la littérature à l'issue des premiers essais cliniques. Les mutations répertoriées sont donc actuellement toutes issues de souches de laboratoire ayant acquis une mutation sous pression antivirale *in vitro*. La mise en évidence du niveau de résistance au MBV conféré par une mutation est plus délicate à évaluer en culture cellulaire que pour le GCV car il a été montré que les valeurs de CI50 de la souche de référence AD169 pouvaient varier entre différents laboratoires de < 0,5 µM (Biron *et al.*, 2002) à 19 µM (Williams *et al.*, 2003). Cette variabilité dépendrait des conditions de culture, de la température ou encore du type de fibroblastes utilisés (de peau ou de poumon) (Chou *et al.*, 2006). A ce jour, les

conditions idéales les plus à même de mimer l'activité antivirale *in vivo* du MBV ne sont pas encore définies. Différentes mutations ont donc été décrites dans des mutants de laboratoire avec des niveaux de résistance très variés (Tableau 5).

| Codon | Acides aminés | | Mutant/sauvage | | Références |
|-------|---------------|--------|----------------|-----------|---|
| | Sauvage | Mutant | MBV IS50 | GCV IS 50 | |
| 353 | V | A | 15 | 1 | (Chou <i>et al.</i> , 2008, Chou <i>et al.</i> , 2007) |
| 397 | L | R | > 200 | 1,6 | (Biron <i>et al.</i> , 2002, Chou <i>et al.</i> , 2007) |
| 409 | T | M | 81 | 0,9 | (Chou <i>et al.</i> , 2007) |
| 411 | H | L | 69 | 0,7 | (Chou <i>et al.</i> , 2008) |
| 411 | H | N | 9 | 1 | (Chou <i>et al.</i> , 2008) |
| 411 | H | Y | 12 | 0,5 | (Chou <i>et al.</i> , 2008) |

Tableau 5: Mutations de résistance de pUL97 au MBV conférant une augmentation de la CI50 après transfert à une souche sauvage

Du fait du mécanisme d'action spécifique du MBV, aucune mutation obtenue après MBV ne croise avec les mutations de résistance au GCV. La découverte de la mutation L397R conférant un très haut niveau de résistance au MBV (IS50 > 200) a permis de montrer que le MBV était un inhibiteur de pUL97 (Biron *et al.*, 2002). V353A et T409M sont les 2 mutations les plus fréquemment sélectionnées *in vitro* (Chou *et al.*, 2007). Il est encore impossible de savoir si ce sont elles qui émergeront *in vivo* chez les patients traités par MBV. Lorsque la pression de sélection se poursuit avec une concentration importante de MBV, apparaissent d'autres mutations aux positions 409 et 411 combinées avec la mutation au codon 353 conférant de très haut niveau de résistance au MBV (IS50 > 150) similaires à ceux conférés par la mutation L397R (Chou *et al.*, 2008). Toutes les mutations décrites à ce jour sont localisées dans le domaine de liaison de l'ATP en amont des mutations de résistance au GCV. Les modélisations suggèrent que le MBV serait un inhibiteur compétitif de l'ATP. Les mutations des acides aminés 353, 409 et 411 provoqueraient un changement de conformation de la poche de fixation (Figure 19). Malgré la présence de ces mutations, l'ECP observé en culture de ces souches est comparable à celui des souches sauvages ce qui suggère que la fonction naturelle de la kinase pUL97 n'est pas affectée.

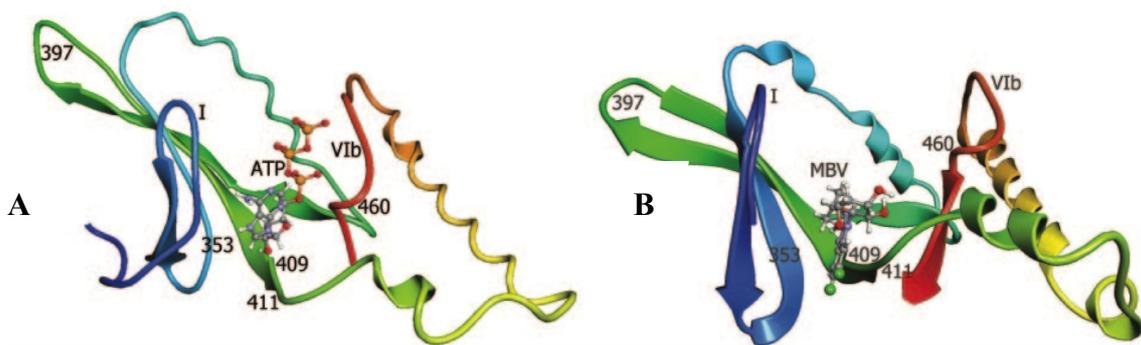


Figure 19: Structure modélisée du site de fixation de l'ATP (A) et du maribavir (B) de la protéine kinase pUL97 du CMVH, déduite d'une homologie de structure avec la protéine kinase de la levure GCN2. Les domaines I et VIb forment une poche dans laquelle viennent se fixer l'ATP ou le maribavir. Les acides aminés impliqués dans la résistance au maribavir (353, 397, 409, 411) ont été localisés sur la structure. Les acides aminés 353, 409 et 411 se trouvent rapprochés du fait de la constitution de deux boucles entre ces résidus. Le résidu 397 est, quant à lui, plus éloigné du site de fixation mais sa mutation provoque un changement de conformation de la poche de fixation par un écartement majoré entre les acides aminés 353 et 409-411. D'après (Chou *et al.*, 2008).

8.2. L'ADN polymérase pUL54

Pour revue (Ducancelle *et al.*, 2006b)

8.2.1. Structure et fonction de pUL54

La polymérase pUL54 est une protéine de 1242 résidus acides aminés, soit 140 kDa, codée par un gène de 3729 pb (souche AD169) localisé dans le segment unique long du CMVH. La séquence de référence a été décrite dès 1986 par Kouzarides et coll. (Kouzarides *et al.*, 1986). Le gène *UL54* comporte un fort degré d'homologie avec les gènes codant les polymérases 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 polymérases virales) (Larder *et al.*, 1987). La structure de la polymérase pUL54 n'a toujours pas pu être étudiée par cristallographie et par analyse aux rayons X. Cependant, la bonne conservation des séquences et des structures des polymérases en général permet d'appréhender la structure de pUL54 grâce à la connaissance de la structure de la polymérase du phage RB89.

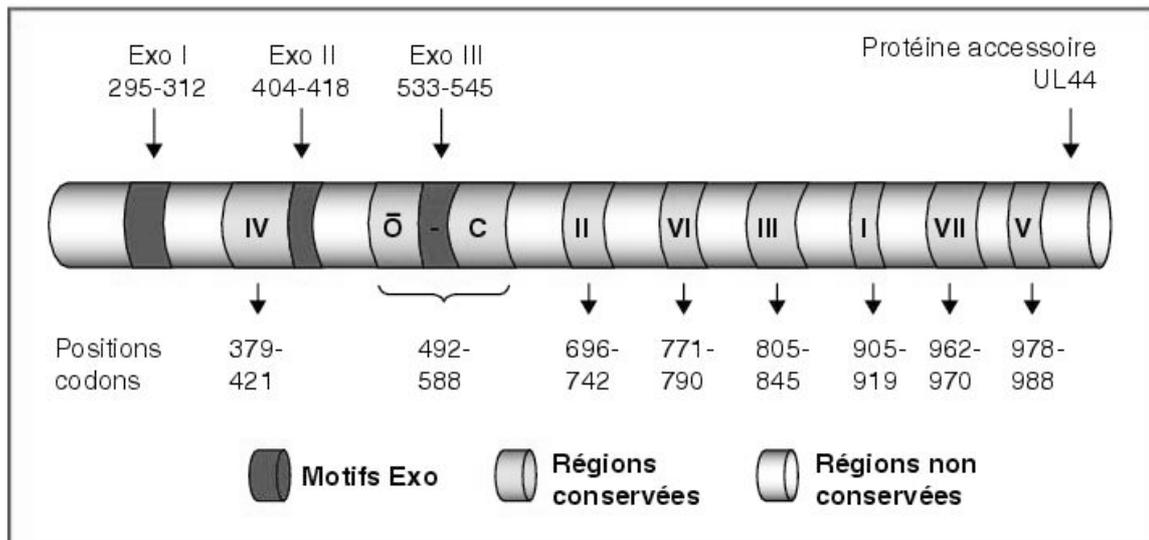


Figure 20: Domaines d'homologies de l'ADN polymérase pUL54 du CMVH (D'après Ducancelle *et al.*, 2006b)

L'alignement des séquences peptidiques des polymérases des herpesvirus (HSV1, CMVH, EBV) avec l' α -polymérase humaine montre l'existence de sept domaines d'homologie numérotés de I à VII par ordre décroissant d'homologie. Leur ordre linéaire à partir de l'extrémité N-terminale est IV, II, VI, III, I, VII, V (Kouzarides *et al.*, 1986) (Larder *et al.*, 1987). Un huitième domaine d'homologie avec les polymérases des virus herpes (domaine δ -C) est localisé entre les domaines IV et II (Ye *et al.*, 1993) (Figure 20).

Ces régions 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.

8.2.1.1. Domaine 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 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. 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.

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).

La région Exo I 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 (Bernad *et al.*, 1989).

La région Exo II comporte plusieurs acides aminés très conservés parmi les polymérases à activité 3'-5' exonucléasique : 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 contient un résidu tyrosine et un résidu aspartate (Y538 et D542) très conservés parmi les polymérases à activité 3'-5' exonucléasique (Derbyshire *et al.*, 1988) (Freemont *et al.*, 1988).

8.2.1.2. Domaine 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).

Sur la base des observations faites sur l'ADN polymérase d'HSV1, Ye et coll. (Ye *et al.*, 1993) ont tenté de définir par mutagenèse dirigée les fonctions des domaines conservés dans la polymérase du CMVH. Des mutations ou délétions, situées dans les domaines centraux ou proches de l'extrémité COOH terminale, entraînent l'abolition totale de l'activité polymérase alors que d'autres mutations, plus proches de l'extrémité NH2 terminale, en dehors des domaines conservés ou dans le domaine II, n'induisent qu'une perte partielle de l'activité catalytique. C'est ainsi qu'une perte de 40 % de l'activité enzymatique est observée pour les mutations en positions 725 et 726 dans la région II de l'ADN polymérase. Les délétions des

acides aminés 910 à 913 (région I), 804 à 807 (région III) et 962 à 964 (domaine V) ont pour conséquence l'abolition totale de l'activité polymérase.

Des études d'affinité menées sur des mutants attribuent à la région III des propriétés de liaison à la matrice ADN et aux régions de la portion COOH terminale (I, III et VII) celles de lier les nucléotides triphosphates (Ye *et al.*, 1993). La région II, du fait de sa richesse en acides aminés basiques ou à fonction amide, se lierait à l'ADN matrice alors que ses résidus glutamate et aspartate seraient impliqués dans la liaison des cations métalliques divalents (Mg^{2+} , Mn^{2+} et Zn^{2+}) à l'origine de l'interaction puis de l'hydrolyse de la fonction phosphodiester des désoxynucléotides triphosphates. Il apparaît également que le site de fixation de ces molécules s'étend sur différentes portions au niveau de la zone centrale et C-terminale de la protéine.

8.2.1.3. Domaine de fixation de la protéine accessoire pUL44

L'activité polymérasique de nombreuses ADN polymérases nécessite 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 *et al.*, 1998). La protéine accessoire du cytomégalo virus humain est la protéine pUL44 dont le site de fixation est localisé à l'extrémité C-terminale de pUL54. La cocristallisation et l'analyse aux rayons X des 290 premiers résidus de la protéine pUL44 et de l'extrémité C-terminale de pUL54 ont permis de mieux appréhender le mode d'interaction entre les deux protéines. 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 *et al.*, 2006). 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 *et al.*, 2000)

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 *et al.*, 2000).

8.2.2. pUL54 et résistance

L'ADN polymérase pUL54 est la cible des trois antiviraux actuellement utilisés dans la prise en charge des infections à CMVH : le GCV, le CDV et le PFA. Après un traitement prolongé par l'une de ces molécules peuvent apparaître des mutations de résistance. Elles sont pour la majorité situées dans l'un des domaines conservés. Le phénotype de résistance diffère selon la localisation de la mutation. Les mutations situées dans le motif ExoI, la partie N-terminale du domaine δ -C, les régions IV et V de l'ADN polymérase sont plutôt responsables d'une résistance croisée au GCV et au CDV (Erice, 1999). Celles localisées dans les régions II, VI et la partie C-terminale du domaine δ -C sont associées à une résistance au PFA (Mousavi-Jazi *et al.*, 2001) (Smith *et al.*, 1998) (Mousavi-Jazi *et al.*, 2003) (Weinberg *et al.*, 2003).

Des profils de résistance très différents sont observés pour les substitutions d'acides aminés situées dans la région III (Chou *et al.*, 1998). Plus récemment, d'autres régions ont été impliquées dans la résistance au foscarnet. La substitution N495K à l'extrémité N-terminale de la région δ -C est responsable de la résistance au foscarnet comme l'ont démontré des expériences de transfert de marqueur (Ducancelle *et al.*, 2006a). Le domaine IV pourrait être aussi impliqué dans la résistance au foscarnet. Les substitutions M393R et M393K ont été retrouvées sur des isolats cliniques de CMVH résistants au foscarnet et la substitution T419M a été sélectionnée *in vitro* en présence de concentrations croissantes de PFA dans une souche de laboratoire. Ainsi les mutations associées à la résistance au foscarnet sont réparties sur l'ensemble du gène. Le Tableau 6 regroupe l'ensemble des mutations de résistance décrites au sein de pUL54.

Le retentissement des mutations de résistance sur l'activité enzymatique de l'ADN polymérase est variable et peut être étudié à partir de souches recombinantes. L'absence de standardisation des techniques mises en œuvre rend difficile la comparaison des résultats obtenus pour les diverses mutations étudiées.

| Région | Mutations | Phénotype de résistance | | | Souches de laboratoire | Souches cliniques | TM | Références |
|-------------|------------|-------------------------|-----|-----|------------------------|-------------------|----|-------------------------------------|
| | | GCV | CDV | PFA | | | | |
| ExoI | C304S | R | R | R | | X | | (Cherrington <i>et al.</i> , 1998) |
| IV | M393R | R | R | R | | X | | (Cherrington <i>et al.</i> , 1998) |
| IV | M393K | R | R | R | | X | | (Cherrington <i>et al.</i> , 1998) |
| IV (ExoII) | N408D | R | R | S | | X | X | (Cihlar <i>et al.</i> , 1998a) |
| IV (ExoII) | N408K | R | R | S | | X | X | (Scott <i>et al.</i> , 2007) |
| IV (ExoII) | F412V | R | R | S | X | | X | (Cihlar <i>et al.</i> , 1998a) |
| IV (ExoII) | F412C | R | R | S | | X | X | (Lurain <i>et al.</i> , 1992) |
| IV (ExoII) | D413E | R | R | S | | X | | (Erice <i>et al.</i> , 1997) |
| δ-C | N495K | S | S | R | | X | X | (Ducancelle <i>et al.</i> , 2006a) |
| δ-C | L501I | R | R | S | X | X | X | (Smith <i>et al.</i> , 1997) |
| δ-C | L501F | R | R | S | | X | | (Erice <i>et al.</i> , 1997) |
| δ-C | T503I | R | R | S | | | | (Smith <i>et al.</i> , 1997) |
| δ-C | K513R | R | R | S | | X | | (Smith <i>et al.</i> , 1997) |
| δ-C | K513E | R | R | S | | X | X | (Smith <i>et al.</i> , 1997) |
| δ-C | K513N | R | R | S | X | | X | (Cihlar <i>et al.</i> , 1998b) |
| δ-C | D515E | R | R | R | | X | | (Eckle <i>et al.</i> , 2000) |
| δ-C | L516M | R | R | R | | X | | (Eckle <i>et al.</i> , 2000) |
| δ-C | I521T | R | R | R | | X | | (Eckle <i>et al.</i> , 2000) |
| δ-C | P522A | R | R | S | | X | | (Erice <i>et al.</i> , 1997) |
| δ-C | P522S | R | R | S | X | X | X | (Cihlar <i>et al.</i> , 1998a) |
| δ-C(ExoIII) | L545S | R | R | S | X | X | X | (Cihlar <i>et al.</i> , 1998a) |
| δ-C | D588E | S | S | R | | X | X | (Cihlar <i>et al.</i> , 1998a) |
| II | T700A | S | S | R | | X | X | (Cihlar <i>et al.</i> , 1998a) |
| II | V715M | S | S | R | | X | X | (Cihlar <i>et al.</i> , 1998a) |
| II | I722V | R | R | S | | X | | (Smith <i>et al.</i> , 1997) |
| II-VI | Y751H | R | R | S | | X | | (Smith <i>et al.</i> , 1997) |
| II-VI | E756Q | | | R | | X | X | (Weinberg <i>et al.</i> , 2003) |
| | E756D | | | R | | X | | |
| | E756K | R | | R | | X | X | (Chou <i>et al.</i> , 2003) |
| VI | L773M | | | R | X | | X | (Mousavi-Jazi <i>et al.</i> , 2003) |
| VI | V781I | R | S | R | | X | X | (Cihlar <i>et al.</i> , 1998a) |
| VI | V787L | R | | | | X | X | (Weinberg <i>et al.</i> , 2003) |
| VI-III | L802M | S/R | S | R | | X | X | (Cihlar <i>et al.</i> , 1998a) |
| III | K805Q | S | R | S | | X | X | (Cihlar <i>et al.</i> , 1998a) |
| III | A809V | R | S | R | | X | X | (Chou <i>et al.</i> , 1997) |
| III | V812L | R | R | R | X | X | X | (Cihlar <i>et al.</i> , 1998a) |
| III | T821I | R | S | R | | | | (Smith <i>et al.</i> , 1997) |
| III | A834P | R | R | R | | X | X | (Scott <i>et al.</i> , 2007) |
| III | G841A | R | R | S | | X | | (Erice <i>et al.</i> , 1997) |
| III | T838A | S | S | R | | X | X | (Springer <i>et al.</i> , 2005) |
| III-I | S897P | R | R | R | | X | | (Smith <i>et al.</i> , 1997) |
| V | A987G | R | R | S | X | X | X | (Cihlar <i>et al.</i> , 1998a) |
| après V | R1052C | R | R | R | X | | | (Smith <i>et al.</i> , 1997) |
| V | Del981-982 | R | R | R | | X | X | (Chou <i>et al.</i> , 2000b) |

Tableau 6: Mutations de l'ADN polymérase pUL54 du CMVH impliquées dans la résistance aux antiviraux. D'après (Ducancelle *et al.*, 2006b).

8.3. La 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 cytomegalovirus. Très peu de données sont disponibles quant à la fonction et à la structure de cette protéine, qui est exprimée durant la phase précoce du cycle viral (Chambers *et al.*, 1999). Récemment, l'analyse de souches de laboratoire résistantes au MBV 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 sur la base d'une réflexion associant l'antiviral et sa cible, déjà évoquée pour pUL97 (Komazin *et al.*, 2003). En 2003, Komazin et coll. ont en effet décrit une substitution, L335P, associée, *in vitro*, à une résistance au maribavir (Komazin *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 à sélectionner des souches résistantes au MBV 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 *et al.*, 2004).

La présence de mutations de résistance au MBV sur pUL27 a fait suggérer l'implication de la protéine, une fois phosphorylée, dans l'étape d'exportation extranucléaire des capsides néoformées en tant que substrat de pUL97, la présence de cette dernière étant essentielle pour cette étape (Chou *et al.*, 2004). L'interaction évoquée entre pUL97 et pUL27 ainsi que la relation enzyme-substrat s'appuient également sur la colocalisation nucléaire des deux protéines et la présence de 4 sites potentiels de phosphorylation de pUL97 (Chou *et al.*, 2004). Cependant, une étude plus récente de Prichard et coll. a révélé que pUL27 n'était pas nécessaire à la réplication du CMVH (Prichard *et al.*, 2006) suggérant que son implication dans l'exportation extranucléaire des capsides n'était pas aussi directe que cela avait pu être envisagé précédemment.

Plus récemment, de nombreuses mutations ou délétions ont été décrites au sein de pUL27 dans des souches de laboratoire ou des isolats cliniques après plusieurs passages sous pression de sélection par le MBV: elles ne conféraient qu'un faible niveau de résistance au MBV (IS50 de 1,7 à 3,1) voire aucune résistance pour certaines mutations. Certaines de ces substitutions ont été retrouvées en association avec des mutations de résistance au MBV de pUL97. D'autres étaient sélectionnées chez des mutants de laboratoire défectifs pour pUL97 et

pourraient ainsi constituer des mutations compensatoires suggérant ainsi un éventuel rôle de pUL27 dans la régulation de l'activité de la kinase pUL97 (Chou, 2009).

8.4. La 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 CMVH. Elle est l'homologue de l'ORF ICP 18.5 de l'herpèsvirus de type 1 (pUL28). La protéine pUL56 est transcrite lors de la phase tardive de la réplication (Batadaram *et al.*, 1994). 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 *et al.*, 2000a). 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 *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 $_{816}RRVRATRKRPRR_{827}$, seuls deux acides aminés, R822 et K823, sont indispensables à la localisation intranucléaire de pUL56 (Giesen *et al.*, 2000b). 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 *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.

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 *et al.*, 2002). L'activité ATPasique s'appuie sur des segments d'acides aminés dont la séquence correspond partiellement à des boîtes de Walker. 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 *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 *et al.*, 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 *et al.*, 1998).

Plus récemment, une étude 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 mais elle n'a toutefois pas permis d'élucider la structure exacte de la protéine. La poursuite de ces travaux a permis de montrer que pUL56 existait sous forme de dimères. Le complexe constitué par deux monomères de pUL56 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 *et al.*, 2004). Enfin cette étude a permis l'élaboration d'un modèle théorique de la structure tridimensionnelle du dimère de pUL56s, présenté Figure 21.

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*.

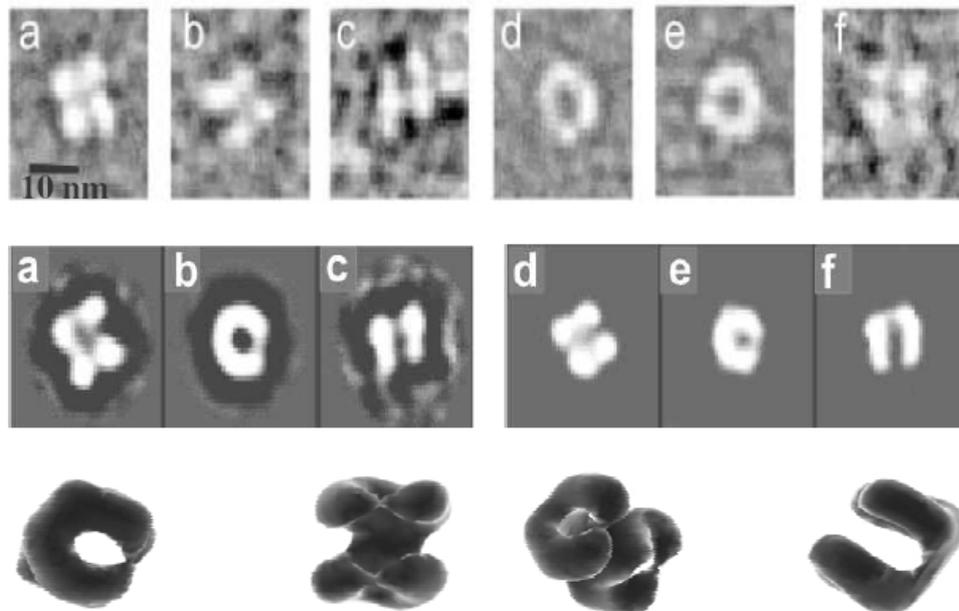


Figure 21: Aspect au microscope électronique et structure tridimensionnelle théorique du dimère de pUL56s

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

8.5. La protéine d'encapsidation pUL89

La protéine d'encapsidation 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 CMVH. 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, 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 *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 herpèsvirus. La boîte de Walker B est généralement constituée d'une séquence consensus Z₅DE, 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 *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 herpèsvirus, 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. Plus récemment, la même équipe a démontré que pUL89 et pUL56 étaient colocalisés dans le noyau au niveau des centres de répliquations des cellules infectées ce qui suggère une interaction entre ces deux protéines. Des expériences de *cross-linking* ont permis de mettre en évidence la zone d'interaction de pUL89 avec pUL56 : il s'agit du peptide

⁵⁸⁰GRDKALAVEQFISRFNSGYIK₆₀₀ de pUL89. La cotransfection d'un virus délété du gène *UL89* et d'un plasmide encodant un gène *UL89* délété du peptide 580-600 aboutit à une absence de cycle répliatif complet, suggérant que ce peptide est suffisant pour l'interaction avec pUL56 et le rôle indispensable de cette interaction pour l'encapsidation de l'ADN viral (Thoma *et al.*, 2006).

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 *et al.*, 1998).

8.6. La 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 capsidie était conservée chez les herpèsvirus (Newcomb *et al.*, 2001).

En 2001, la structure des complexes constitués par la protéine pUL6 a été caractérisée en microscopie électronique par Newcomb et coll. 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, qui 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 *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 capsidie, 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 *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 CMVH (Dittmer *et al.*, 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 coll. 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, 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 *et al.*, 2004).

La dernière étude portant sur pUL104 a confirmé par *cross-linking* et retard sur gel que cette protéine était capable de former des dimères ou des multimères. L'analyse en microscopie électronique a révélé que pUL104 s'assemblait en une forme multimérique pour constituer une structure « portail » *ad integrum* (Figure 22). Il est donc admis que le complexe « portail » ne serait constitué que de monomères de pUL104 sans qu'aucune autre protéine virale ne soit nécessaire (Holzenburg *et al.*, 2009).

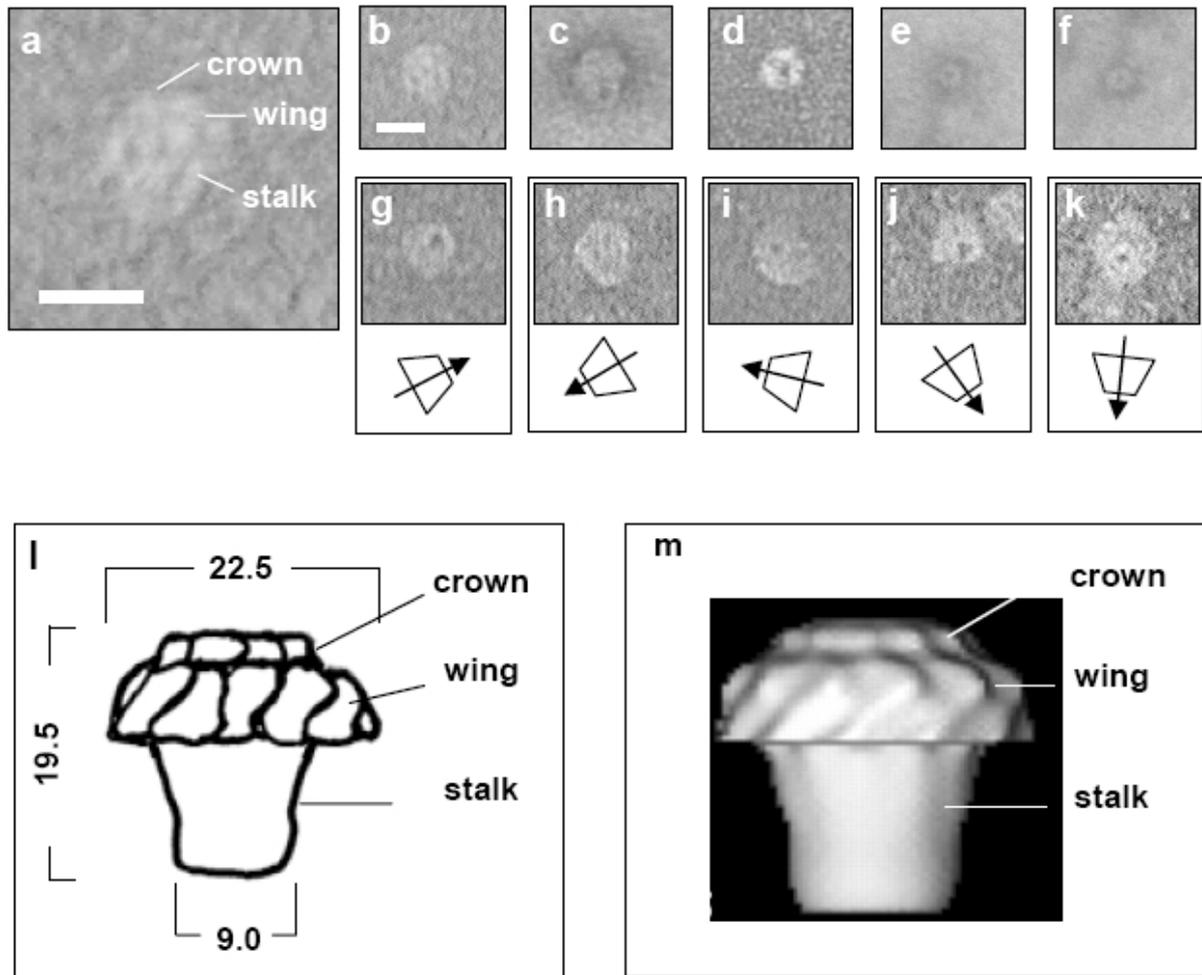


Figure 22: Observation au microscope électronique des oligomères formés par la protéine pUL104 du cytomégalo virus et proposition d'un modèle. (a, b, c) L'assemblage du portail complet vu de profil en soulignant la couronne (crown), l'aile (wing) et la tige (stalk) du complexe. Vues axiales du complexe depuis la couronne (d) et depuis la tige (e,f). En (g-k), projections obliques (quasi axial) soulignant la tige en saillie de l'aile. Pour chaque projection, un dessin, dans lequel la flèche pointe dans la direction de l'embouchure de la tige, aide à l'identification de l'orientation. En (l), figure représentant le complexe portail du CMVH et en (m) un modèle du complexe portail du bactériophage Phi indiquant la couronne, l'aile et la tige. L'échelle correspond à 20 nm. D'après (Holzenburg *et al.*, 2009).

Objectifs

Devant le poids de l'infection à CMV chez les transplantés, la nécessité d'une prise en charge thérapeutique efficace s'avère indispensable. Le traitement doit souvent être administré de façon prolongée, en prophylaxie et en traitement curatif. Depuis plusieurs années, il a été clairement démontré que ces traitements prolongés conduisaient à une apparition de mutations de résistance aux molécules administrées. Il nous a donc semblé indispensable de mettre au point, dans notre laboratoire des techniques de génotypage des gènes cibles *UL97* et *UL54*. Précédemment, nous avons appliqué la technique de génotypage du gène *UL97* à la recherche de mutations de résistance chez des patients transplantés rénaux traités par GCV, inclus dans une étude multicentrique rétrospective (Alain *et al.*, 2004). Le développement du génotypage du gène *UL54* a fait l'objet du travail de thèse de Gaël Champier, soutenue en juin 2006. Notre travail comporte une approche clinique et une étude fondamentale des cibles des antiviraux actuels ou en développement.

La première partie de notre travail porte sur l'approche clinique, à travers la surveillance de l'émergence de souches résistantes chez les patients immunodéprimés et plus particulièrement les transplantés. Dans un premier temps au sein du Centre National de Référence des Cytomégalo virus (CNR) puis de façon systématique sur une cohorte multicentrique de patients transplantés, nous avons recherché les facteurs de risque d'émergence de résistance et caractérisé les souches mutées sur le plan phénotypique et génotypique.

La mise en évidence de mutations nouvelles, mais aussi le développement d'un nouvel antiviral, le MBV, ciblant la protéine kinase virale pUL97 nous a amené à nous interroger sur les relations structure-fonction de pUL97 mais aussi sur le rôle particulier joué par son cofacteur potentiel pUL27 en utilisant les données du polymorphisme naturel et la modélisation *in silico* de cette protéine.

L'observation attentive de ces patients transplantés traités par les antiviraux actuels met en évidence des situations d'échec thérapeutique pouvant être expliquées par l'apparition de mutations de résistance et par la toxicité de ces drogues. La nécessité de nouveaux antiviraux apparaît évidente. C'est pourquoi, poursuivant le travail commencé par Gaël Champier au sein de notre laboratoire, nous avons étudié et approfondi l'analyse des domaines fonctionnels des terminases pUL56 et pUL89, cibles des dérivés benzimidazolés dextrogyres (BDCRB, TCRB) qui inhibent l'étape d'encapsidation de l'ADN viral. Pour ce

travail, nous avons utilisé l'association de modélisation *in silico* et la production de protéines complètes ou de fragments correspondant à des domaines fonctionnels définis sur la base de l'étude du polymorphisme naturel de ces protéines. Ces travaux ont été réalisés en collaboration avec l'Institut de Pharmacologie Chimique et Génétique de l'Université Paris V.

Résultats

Partie 1

Surveillance de la résistance du cytomégalovirus aux antiviraux chez les patients transplantés : outils et épidémiologie

Publication 1: Etude de la résistance du cytomegalovirus aux antiviraux chez les patients transplantés français à l'ère de la prophylaxie

Cytomegalovirus resistance in the real-life of transplant recipients at the prophylaxis era: the French cohort experience.

Sébastien Hantz, Françoise Garnier, Marie-Christine Mazon, Sébastien Cotin, Marie Essig, Jean Philippe Rerolle, Franck Saint Marcoux, Isabelle Garrigue, Pierre Merville, Catherine Mengelle, Lionel Rostaing, Nassim Kamar, Raphaëlle Germe, François Bayle, Céline Bressollette, Sylvie Pillet, Catherine Gaudy, Yvon Lebranchu, Geneviève Billaud, Claire Pouteil-Noble, Pascal Turlure and Sophie Alain for the “French CMV resistance survey study group”

American Journal of Transplantation (soumis)

A partir d'une cohorte multicentrique basée sur le volontariat des centres de transplantation et des laboratoires de Virologie et en étroite collaboration avec les cliniciens, nous avons souhaité étudier les caractéristiques épidémiologiques des résistances, compte tenu de l'hétérogénéité des pratiques en matière de surveillance virologique et de traitement de l'infection à CMV. Nous avons débuté ce travail dans le cadre d'un PHRC interrégional obtenu en 2006 : « Résistance du cytomegalovirus aux antiviraux après transplantation d'organe et greffe de moelle, à l'ère de la prophylaxie » (investigateur principal : Professeur Sophie Alain). Trente-trois centres sont ouverts à ce jour et ont permis l'inclusion de plus de 500 patients. Les patients sont inclus dès leur première infection active à CMV (charge virale ou antigénémie positive) et suivis ensuite pendant 3 ans. En cas de résistance clinique (persistance de la réplication virale plus de 3 semaines sous traitement), une étude phénotypique et génotypique (séquençage des gènes *UL97* et *UL54*) de la souche est effectuée à l'aide des outils précédemment développés au laboratoire et le traitement est alors adapté.

Pour chaque patient inclus, nous recueillions les informations cliniques, thérapeutiques (traitements antiviraux, régime immunosuppresseur) et biologiques nécessaires à l'analyse et à l'interprétation des résultats obtenus.

Notre travail porte sur l'étude de 443 patients de cette cohorte. Parmi ces patients, 97 ont été exclus de nos calculs en raison de l'absence de prise d'antiviral. Une résistance clinique au GCV a été suspectée dans 37 cas sur 346 (10,7 %). Parmi ces 37 patients on dénombrait 23 receveurs de rein (10,3% des transplantés rénaux), 2 receveurs de cœur (7,1% des transplantés cardiaques), 3 receveurs de foie (12,5% des transplantés hépatiques), 5 receveurs de poumons (72% des transplantés pulmonaires) et 4 receveurs de cellules souches hématopoïétiques (6,8% des receveurs de moelle). Des mutations de résistance ont été détectées chez 18 patients. La prévalence de la résistance dans notre étude est ainsi évaluée à 5,2%, toutes greffes d'organes confondues. L'incidence a été évaluée à 4,12 cas pour 100 patient-années. La présentation clinique à l'inclusion des patients avec ou sans mutation de résistance n'était pas différente. Quant à l'évolution clinique, elle semble plus défavorable chez les patients présentant une mutation de résistance.

Parmi les facteurs de risque habituellement décrits comme associés à la survenue de mutations de résistance, la charge virale à l'inclusion était relativement similaire aux environ de 3,6 log₁₀ quelque soit le groupe avec ou sans mutation de résistance. La primo-infection du receveur a, par contre, été retrouvée comme un facteur de risque de survenue de résistance tandis que la prophylaxie n'apparaît pas, dans cette étude, être plus en faveur de l'émergence de mutations de résistance.

La majorité des mutations de résistance des souches de CMVH détectées dans cette étude a été précédemment décrite dans la littérature. Dix-sept patients sur 18 hébergent une souche de CMVH avec une mutation de résistance dans le gène *UL97* et parmi eux, 7 ont des mutations dans les deux gènes *UL97* et *UL54*. Un patient héberge une souche présentant uniquement une mutation de résistance dans *UL54* (A834P) conférant une résistance multiple au GCV, CDV et PFA. La surveillance de cette cohorte nous a permis de détecter 4 nouvelles mutations du gène *UL54* dont l'implication dans la résistance reste à prouver : mutations D515G, D515Y, A614S et S897L parmi lesquelles 3/4 sont de nouvelles substitutions d'acides aminés sur des sites connus de résistance (D515G, D515Y, S897L). L'analyse du niveau de résistance de ces mutations est en cours de réalisation.

Cytomegalovirus resistance in the real-life of transplant recipients at the prophylaxis era: the French cohort experience.

Sébastien Hantz^{1,2}, Françoise Garnier^{1,2}, Marie-Christine Mazon³, Sébastien Cotin¹, Marie Essig⁴, Jean Philippe Rerolle⁴, Franck Saint Marcoux⁵, Isabelle Garrigue⁶, Pierre Merville⁷, Catherine Mengelle⁸, Lionel Rostaing⁹, Nassim Kamar⁹, Raphaëlle Germe¹⁰, Francis Bayle, Céline Bressollette¹¹, Sylvie Pillet¹², Catherine Gaudy¹³, Yvon Lebranchu¹⁴, Geneviève Billaud¹⁵, Claire Pouteil-Noble¹⁶, Pascal Turlure¹⁷ and Sophie Alain^{1,2} for the “French CMV resistance survey study group” *

1 : Université de Limoges, Faculté de Médecine, EA 3175, Limoges, France

2 : Centre National de Référence du CMV, Bacteriology-Virology Laboratory, Centre Hospitalier Universitaire (CHU) Limoges, Limoges, France.

3 : Centre National de Référence du CMV associated Laboratory, Bacteriology-Virology Laboratory, Centre Hospitalier Universitaire (CHU) Lariboisière, Paris, France.

4 : Centre Hospitalier Universitaire (CHU) Limoges, Nephrology department, Limoges, France.

5 : Centre Hospitalier Universitaire (CHU) Limoges, Pharmacology department, Limoges, France.

6 : Centre Hospitalier Universitaire (CHU) Bordeaux, Virology Laboratory, Bordeaux, France.

7 : Centre Hospitalier Universitaire (CHU) Bordeaux, Nephrology department, Bordeaux, France.

8 : Centre Hospitalier Universitaire (CHU) Toulouse, Virology Laboratory, Bordeaux, France.

9 : Centre Hospitalier Universitaire (CHU) Toulouse, Nephrology department, Toulouse, France.

10 : Centre Hospitalier Universitaire (CHU) Grenoble, Virology Laboratory, Grenoble, France.

11 : Centre Hospitalier Universitaire (CHU) Nantes, Virology Laboratory, Nantes, France.

12 : Centre Hospitalier Universitaire (CHU) St-Etienne, Virology Laboratory, St-Etienne, France.

13 : Centre Hospitalier Universitaire (CHU) Tours, Virology Laboratory, Tours, France.

14 : Centre Hospitalier Universitaire (CHU) Tours, Nephrology department, Tours, France.

15 : Centre Hospitalier Universitaire (CHU) Lyon, Virology Laboratory, Lyon, France.

16 : Centre Hospitalier Universitaire (CHU) Lyon, Nephrology department, Lyon, France.

17 : Centre Hospitalier Universitaire (CHU) Limoges, Haematology department, Limoges, France.

Corresponding author :

Pr. Sophie Alain MD, PHD

French National Cytomegalovirus Reference Center

Virology Department, Teacher Hospital DUPUYTREN, 2 avenue Martin Luther King, 87000 Limoges

EA 3175, Faculty of Medicine, Limoges

e-mail : sophie.alain@unilim.fr

* **The other members of the** “French CMV resistance survey study group” have contributed to inclusion of patients and data collection and should therefore be considered as co-authors.

List of the members is provided at the end of the manuscript.

Cette étude est la plus grande cohorte prospective mondiale de patients transplantés pour la surveillance de la résistance du CMVH aux antiviraux. Au-delà de son importance en terme de patients inclus, cette cohorte permet de mieux comprendre l'émergence des mutations de résistance en pratique clinique hors de tout protocole d'étude thérapeutique d'un antiviral donné.

En comparaison avec des cohortes similaires nord-américaines (Lurain *et al.*, 2002), le taux global d'émergence de mutations de résistance est inférieur (5,2% versus 9,5%) mais avec une répartition similaire par groupe d'organes transplantés. Le facteur de risque majeur d'émergence de résistance demeure le statut D+/R- alors que l'usage d'une prophylaxie, la durée total de traitement, l'administration d'anticorps antilymphocytaires et la charge virale à l'inclusion ne ressortent dans cette étude en tant que facteur de risque. Cependant, nous avons également montré que des cas de résistance peuvent survenir chez des patients séropositifs pour le CMVH.

Le génotypage des gènes *UL97* et *UL54* a permis de retrouver des mutations classiquement décrites dans la littérature mais la détection d'une mutation de *UL54* (A834P), conférant à elle seule une résistance croisée au GCV, CDV et PFA, nous a conforté dans l'idée que la recherche de résistance implique un séquençage systématique des deux gènes cibles des antiviraux actuellement utilisés.

En outre, cette étude a permis de mettre en place une activité de génotypage des gènes de résistance du CMVH permettant de répondre au clinicien en temps réel sur la présence éventuelle d'une souche résistante afin d'adapter au mieux la stratégie thérapeutique des patients transplantés pour lesquels l'utilisation des traitements antiviraux est assez complexe du fait de la polymédication et des nombreux effets secondaires de ces molécules.

Partie 2

**Mécanisme de résistance du cytomégalovirus au
GCV et au MBV :
études des relations structure-fonction des protéines
pUL97 et pUL27**

Publication 2 : Etude d'une nouvelle mutation de résistance au GCV sélectionnée par prophylaxie au VCV et traitement de courte durée par GCV après transplantation rénale.

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.

Sébastien Hantz, Detlef Michel, Anne-Marie Fillet, Vincent Guignonis, Gaël Champier, Marie-Christine Mazon, Albert Bensman, François Denis, Thomas Mertens, Axelle Dehee, Sophie
Alain

Antimicrobial Agents and Chemotherapy. 2005 ; 49 :1580-1583.

Dans le cadre de la surveillance des patients transplantés, a été décrit l'émergence d'un isolat résistant au GCV, portant une nouvelle mutation de la phosphotransférase pUL97, après prophylaxie par VCV et traitement de courte durée par GCV.

L'étude porte sur un patient séronégatif traité après allogreffe d'un rein prélevé chez un donneur séropositif (D+/R-). La prophylaxie par VCV, destinée à limiter le risque de survenue de maladie à CMV, a débuté deux jours après la greffe. Le suivi de l'infection à CMV a été réalisé par mesure de l'antigénémie pp65. Après 64 jours de traitement, une infection asymptomatique a été diagnostiquée conduisant les cliniciens à mettre en place un traitement curatif par GCV. Ce traitement poursuivi pendant 3 semaines a permis de stopper la réplication virale. Le traitement prophylactique par VCV a repris au 83ème jour post-greffe. Cependant, l'antigénémie est rapidement redevenue positive, conduisant les cliniciens à prescrire, de nouveau, un traitement par GCV dès le 96ème 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 GCV 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 68ème et au 133ème jour post-greffe (respectivement notés G1 et G2). Le phénotype de résistance au GCV et à l'ACV 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*.

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 68ème jour et le 133ème jour post-greffe. En effet, avec des CI50 de 2 µM et 60 µM, respectivement, l'isolat G1 est sensible au GCV et à l'ACV. 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 µM pour le GCV et 123 µM 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 GCV, nous avons transféré le gène *UL97* muté à un virus vaccinal recombinant selon la méthode décrite par Metzger et Michel (Metzger *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 *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 GCV et, d'autre part, que ce défaut de phosphorylation du GCV n'est pas lié à l'activité d'autophosphorylation de pUL97.

Ainsi, cette étude a permis, d'une part, de décrire l'émergence d'une résistance après prophylaxie au VCV et traitement de courte durée par GCV, et d'autre part, de démontrer le rôle de la délétion T601 dans la résistance au GCV. Cette délétion est située au niveau du domaine de fixation probable du GCV en tant que substrat de pUL97.

La publication, après ce travail, de modèles de pUL97, dérivé de kinases homologues permet de localiser la délétion 601 dans le domaine IX sur la boucle de fixation du GCV (Romaker *et al.*, 2006)(Figure 23).

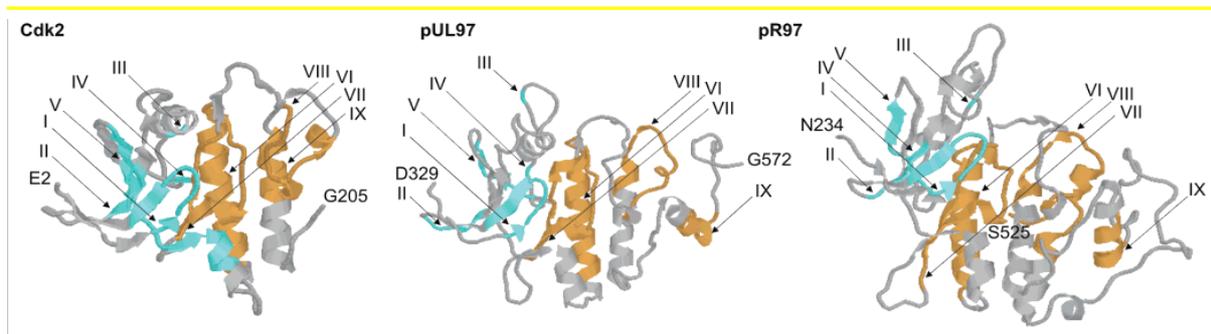


Figure 23 : Prédiction de structure tri-dimensionnelle des domaines fonctionnels de deux herpesvirus (CMVH et RCMV) par homologie avec la structure de la cdk2. Les domaines marqués en bleu constituent le site potentiel de fixation de l'ATP tandis que les domaines orange représentent le site catalytique potentiel.

Publication 3 : Domaines conservés et prédiction de structure de la protéine pUL27 du cytomegalovirus humain.

Conserved domains and structure prediction of human cytomegalovirus UL27 protein

Sébastien Hantz, Anthony Couvreur, Gaël Champier, Laurene Trapes, Sébastien Cotin, François Denis, Serge Bouaziz, Sophie Alain

Antiviral Therapy. 2009 ; 14 : 663-672

Depuis plusieurs années, l'apparition de mutations de résistance au GCV, CDV et PFA ainsi que les nombreux effets secondaires de ces molécules ont conduit au développement de nouveaux antiviraux. Parmi eux, nombreux sont ceux qui n'ont pas atteint le stade d'essais cliniques chez l'homme du fait d'une faible biodisponibilité ou d'une efficacité insuffisante *in vitro*. Cependant, une molécule a émergé au cours des dix dernières années : le MBV. Cette molécule, de la classe des indolocarbazoles, inhibe directement la kinase pU97, comme en attestent les mutations de résistance précédemment décrites dans la région de fixation de l'ATP. L'analyse de souches de laboratoire résistantes au MBV a permis de décrire des mutations associées à la résistance au sein du gène *UL27*: R233S, L335P, W362R, et A406V et la délétion de la partie C terminale de la protéine à partir du résidu 415 (Chou *et al.*, 2004).

L'existence de ces mutations de résistance nous a fait supposer, par analogie avec les autres protéines cibles des antiviraux, une implication de cette protéine dans le mécanisme d'action de cette classe de molécules. Toutes ces mutations induisent cependant des niveaux de résistance au MBV 5 à 10 fois inférieurs à celui induit par la mutation de résistance L397R identifiée sur pUL97. Dans une publication récente, de nouvelles mutations de résistance au MBV ont été générées après plusieurs passages sous pression de sélection par le MBV (Chou, 2009). La description de très nombreuses mutations tout au long de pUL27 ainsi qu'une délétion de plus des $\frac{3}{4}$ de la protéine (extrémité C-terminale) suggère que pUL27 ne serait pas

directement impliquée dans le mode d'action du MBV mais pourrait agir indirectement en interaction avec pUL97 ou encore être une protéine régulatrice de pUL97.

A partir de la séquence du gène *UL27* des 4 souches de référence et de 24 isolats cliniques, nous avons défini son polymorphisme naturel par rapport à la séquence de la souche AD169. La séquence de pUL27 a été alignée avec celles d'homologues d'autres herpèsvirus humains et animaux et la séquence de 8 souches de CMVH résistantes au ganciclovir a été analysée. Nous avons confronté les résultats de l'alignement avec les prédictions de structure secondaire d'une part et la nature des acides aminés parfaitement ou fortement conservés (notamment leur degré d'hydrophobicité) d'autre part. Cela nous a permis de décrire quatre domaines conservés, de localiser les sites putatifs de phosphorylation et d'identifier les domaines d'interface protéine-protéine (plus particulièrement au niveau de l'hélice alpha du domaine conservé III), suggérant que pUL27 peut interagir soit avec pUL97 soit avec elle-même. Bien que la fonction réelle de pUL27 soit encore inconnue dans le cycle de réplication du CMV, notre approche a conduit à cibler les domaines, qui semblent être essentiels à la fonction de pUL27. Ce travail, en collaboration avec l'équipe de Serge Bouaziz (Département de Pharmacologie chimique et Génétique INSERM U640, CNRS UMR 8151, UFR des Sciences Pharmaceutiques et Biologiques, Paris) pour la modélisation moléculaire a permis de mieux comprendre l'importance relative de chaque mutation de pUL27 et constitue un pré-requis pour une analyse ultérieure lorsque la structure en trois dimensions d'un homologue de pUL27 sera disponible.

Au travers de la cohorte de patients transplantés suivie dans le cadre du PHRC, il apparaît de plus en plus évident que la mise sur le marché de nouveaux antiviraux devient urgente, avec des molécules plus adaptés à ces patients fragiles, dont la prise en charge est déjà très lourde sans avoir à redouter l'hémo- et la néphrotoxicité des antiviraux actuels. L'apparition du MBV a suscité de grands espoirs lors des essais *in vitro* et des premiers essais cliniques. C'est une molécule qui a montré une très bonne efficacité avec une bonne biodisponibilité en prise orale dans des essais de phase II (Winston *et al.*, 2008) et des effets secondaires négligeables comparés aux antiviraux ciblant l'ADN polymérase grâce à un mécanisme d'action impliquant la kinase pUL97. Cependant, une étude de phase III chez les receveurs d'allogreffes de moelle comparant MBV versus un placebo en prophylaxie n'a pas montré une efficacité suffisante du MBV, justifiant un arrêt de l'essai (<http://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT00411645>). Les essais de phase III chez les receveurs d'organes solides sont en cours d'analyse (<http://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT00497796>). A ce jour, il est encore difficile d'apprécier quelle sera la place de cette molécule dans la prise en charge des transplantés. Les différents protocoles en cours n'ont peut-être pas suffisamment bien défini les modalités d'utilisation de cette molécule (dose, population cible, stratégie thérapeutique). En tout état de cause, même si de grands espoirs reposent sur cette molécule, l'apparition de mutations de résistance *in vitro* dans pUL97 laisse craindre l'émergence de mutations similaires au sein de son site de fixation sur pUL97 si son utilisation tend à se diffuser largement. Ainsi, le développement d'autres molécules est nécessaire pour élargir l'arsenal thérapeutique anti-cytomégalovirus et éviter de se retrouver dans des impasses thérapeutiques. Des molécules de la classe des dérivés benzimidazolés D-ribonucléosidiques ont été développées parallèlement au MBV. Leur cible est le complexe protéique terminase impliqué dans l'encapsidation de l'ADN viral dans les capsides néoformées. Afin de mieux comprendre le mode d'action de ces antiviraux et de permettre l'élaboration de nouvelles molécules ciblant cette étape, nous nous sommes intéressés aux protéines impliquées dans le complexe terminase.

Partie 3

**Etude du complexe d'encapsulation de l'ADN viral,
cible des dérivés benzimidazolés D-ribonucléosides**

Publication 4 : Domaines fonctionnels potentiels de la protéine pUL56 du cytomégalo virus humain impliqués dans la dimérisation de la protéine et l'activité des benzimidazolés D-ribonucléosides.

Putative functional domains of human cytomegalovirus pUL56 involved in dimerization and benzimidazole D-ribonucleoside activity.

Gaël Champier, Anthony Couvreur, Sébastien Hantz, Armelle Rametti, Marie-Christine Mazon, Serge Bouaziz, François Denis, Sophie Alain.

Antiviral Therapy. 2008 ; 13 : 643-654

L'objectif de ce travail était, d'une part, de développer des outils pouvant être utilisés pour étudier l'émergence des résistances, lorsque des molécules ciblant les protéines du complexe terminase seront administrées en pratique clinique pour la prévention et le traitement curatif des infections à CMVH, et 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. Dans le cadre de notre étude sur les protéines du complexe terminase, nous nous sommes intéressés dans un premier temps à la protéine pUL56.

La protéine pUL56 intervient dans le clivage des concatémères de génome viral synthétisés au cours de la réplication. Elle reconnaît les signaux de clivage (séquences *pac*) (Bogner *et al.*, 1998), s'associe à la terminase pUL89 (Bogner, 2002), catalyse l'hydrolyse de l'ATP (Hwang *et al.*, 2002) 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 capsid néoformée. Les précédentes études d'analyse de la séquence de pUL56 ont suggéré que la protéine posséderait un motif de liaison métallique entre les acides aminés 181 et 233 (Krosky *et al.*, 1998), un

motif leucine zipper entre les acides aminés 726 et 758 (Bogner, 2002) et un domaine de localisation nucléaire (NLS) impliquant les acides aminés R822 et K823 (domaine KRPRR) à l'extrémité C-terminale de la protéine (Giesen *et al.*, 2000b).

Nous avons cherché à 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. Pour cela, nous avons 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 de 12 herpèsvirus humains et animaux. Nous nous sommes plus particulièrement intéressés au domaine dans lequel une mutation Q204R de résistance au BDCRB et au TCRB a été précédemment décrite au sein d'une potentielle structure en doigt de zinc.

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. 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 celles de 12 homologues d'herpèsvirus 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 conduit 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'encapsulation 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 reconnaissance et de fixation des séquences *pac* et le domaine catalytique endonucléasique du complexe d'encapsulation. 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.

A proximité de ce motif en doigt de zinc se situerait un motif en leucine-zipper, homologue de celui de gp49 (gp49-LZ2). La prédiction de structure de cette région pUL56 (249-261) suggère une hélice α , ce qui est compatible avec l'existence d'un leucine-zipper à cet endroit. Par contre, l'alignement des deux protéines n'a pas permis de trouver l'homologue de gp49-LZ1 dans cette partie de pUL56 qui permettrait de stabiliser le dimère de pUL56. Cependant, l'analyse de la partie C terminale de pUL56 a identifié deux fragments dont la séquence pouvait correspondre à des leucines-zippers. Le premier pUL56(688-711) contient les leucines L688, L702, L708 ; il est structuré en hélice α . Le deuxième leucine zipper potentiel, pUL56(741-764), est une hélice α , qui implique les leucines L742, L743, L756, L760 et L764. Pour ces deux domaines, les leucines sont disposées de part et d'autre de l'axe de l'hélice, ce qui confirme l'hypothèse des leucine-zippers. Ainsi ces deux domaines pourraient être impliqués 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. Considérant la structure de pUL56 et l'homologie avec gp49 et les *DNA junction-resolvases*, nous suggérons que la dimérisation de pUL56 nécessite la présence du doigt de zinc et des leucines-zipper précédemment décrits et est un prérequis pour la liaison à l'ADN. Ces hypothèses nécessitent toutefois d'être vérifiées par des expérimentations et par des études structurales.

Afin de mieux comprendre les relations structure-fonction des protéines du complexe terminase (pUL56 et pUL89), il nous est apparu important de déterminer la zone d'interaction entre ces deux protéines afin de pouvoir l'inhiber avec une molécule se fixant spécifiquement au niveau de cette zone. La zone d'interaction minimale dans pUL89 a été décrite récemment et correspond à un peptide de 20 acides aminés : pUL89(580-600) (Thoma *et al.*, 2006). Le but de notre travail consistait à identifier la zone d'interaction complémentaire de pUL56 interagissant avec pUL89. Nous avons donc choisi de produire la protéine pUL56, des peptides de cette protéine contenant certains des domaines fonctionnels que nous avons définis dans notre précédent travail ainsi que la protéine pUL89, et ce en quantité suffisante pour permettre des études de structure par RMN et des études d'interaction en *cross-linking*. Les domaines fonctionnels ont été choisis en fonction de trois critères : la structure secondaire prédite de la protéine, sa courbe d'hydrophobicité (les régions hydrophobes correspondant à des régions fonctionnelles) et les régions conservées de la protéine par rapport à ses homologues (Figure 24). Les différents domaines choisis sont regroupés dans le Tableau 7.

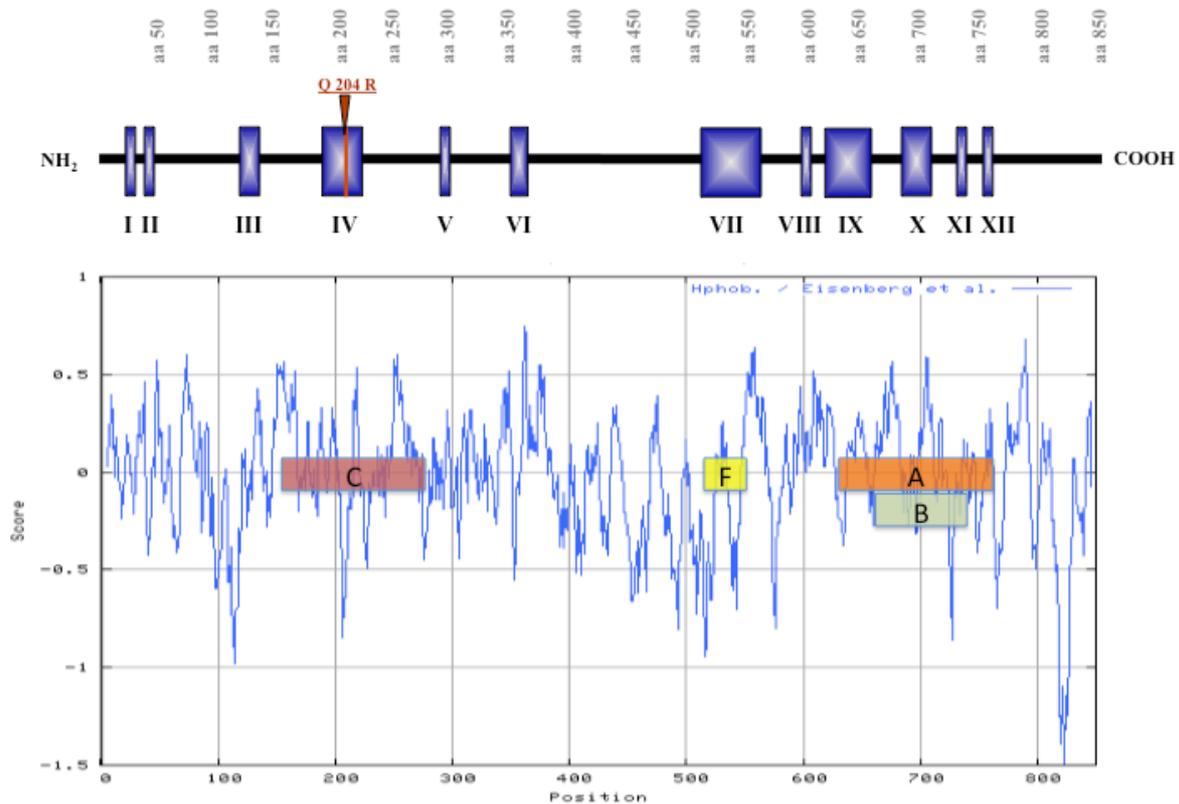


Figure 24 : Régions conservées de pUL56 et courbe d'hydrophobicité de pUL56 déterminée selon la méthode d'Eisenberg (<http://www.expasy.ch/tools/pscale/Hphob.Eisenberg.html>) (Eisenberg *et al.*, 1984). Q204R : mutation de résistance aux benzimidazolés. A, B, C et F : fragments de pUL56 utilisés pour la production.

| Noms | P.M. | Localisation | Séquence en aa | Propriété |
|----------------|----------|--------------------|----------------|---|
| A | 42 kDa | Partie C-terminale | aa 625-770 | Région riche en hélices α , très hydrophobe |
| B | 8,9 kDa | Partie C-terminale | aa 665-739 | Contient une hélice α |
| C | 39,3 kDa | Partie N-terminale | aa 152-272 | Contient de doigt de zinc et le site de résistance aux dérivés benzimidazolés |
| F | 5 kDa | Partie C-terminale | aa 507-549 | Contient une hélice α |
| pUL89(580-600) | 2,4 kDa | Partie C-terminale | aa 580-600 | Domaine d'interaction avec pUL56 |

Tableau 7: Liste des différents fragments peptidiques de pUL56 et pUL89 clonés dans le vecteur pGEX-6P-1 pour la production (P.M. : poids moléculaire)

Ces peptides et protéines ont été produits dans un système procaryote (*Escherichia coli*) sous forme recombinante après clonage dans le vecteur d'expression pGEX-6P-1 (Figure 25) permettant une production de l'insert cloné en phase traductionnelle avec un marquage GST (glutathione-S-transférase), afin d'analyser d'une part leur structure tridimensionnelle en RMN (en collaboration avec l'équipe de l'Unité de Pharmacologie Chimique et Génétique, Inserm U640 - CNRS UMR 8151, de la faculté de pharmacie de Paris V, dirigée par S. Bouaziz) et d'autre part leur interaction avec pUL89.

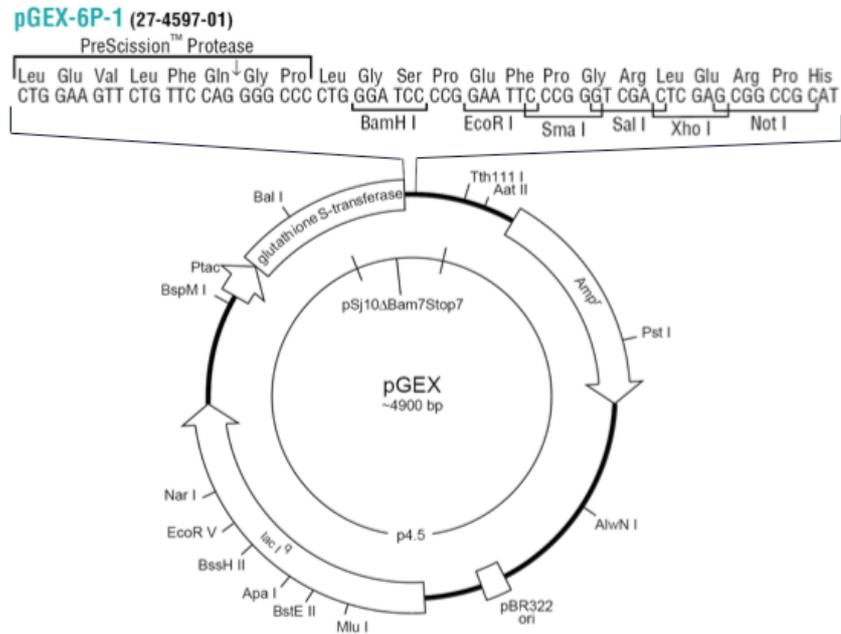


Figure 25 : Carte du vecteur de production pGEX-6P-1 (Amersham). Le site de clonage multiple est en phase traductionnelle avec un marquage GST (glutathione-S-transférase). Un gène de résistance à l'ampicilline permet la sélection des bactéries transformées.

Seuls les résultats concernant l'optimisation des conditions de production et de purification de pUL56 seront exposés en détail, un protocole expérimental identique ayant été appliqué à la production de la protéine pUL89 et les différents fragments de pUL56.

Production

La première étape de ce projet a consisté à optimiser les conditions de production de ces différents peptides et protéines. Pour chacun d'entre-eux, il a fallu définir le temps optimal de

culture pour obtenir la meilleur rendement de production ainsi que la concentration optimale d'IPTG (Isopropyl-thio- β -D-galactoside) permettant l'induction de cette production.

Purification

A l'issue de la production, une centrifugation permet de séparer le culot cellulaire du surnageant. L'analyse de ces deux fractions permet de retrouver nos différentes protéines et peptides d'intérêt dans le culot cellulaire. Afin d'améliorer la solubilisation de pUL56 à partir des membranes bactériennes présentes dans le culot, nous avons testé différentes procédures. L'ajout d'un détergent, le sarkosyl (Sigma) au moment de la lyse bactérienne a été testé. Quelle que soit la concentration de sarkosyl, la solubilisation de pUL56 reste partielle (Figure 26). De surcroît, son utilisation a été abandonnée car il inhibe ultérieurement l'éluion de la protéine et son clivage sur billes par la PreScission Protease (Amersham).

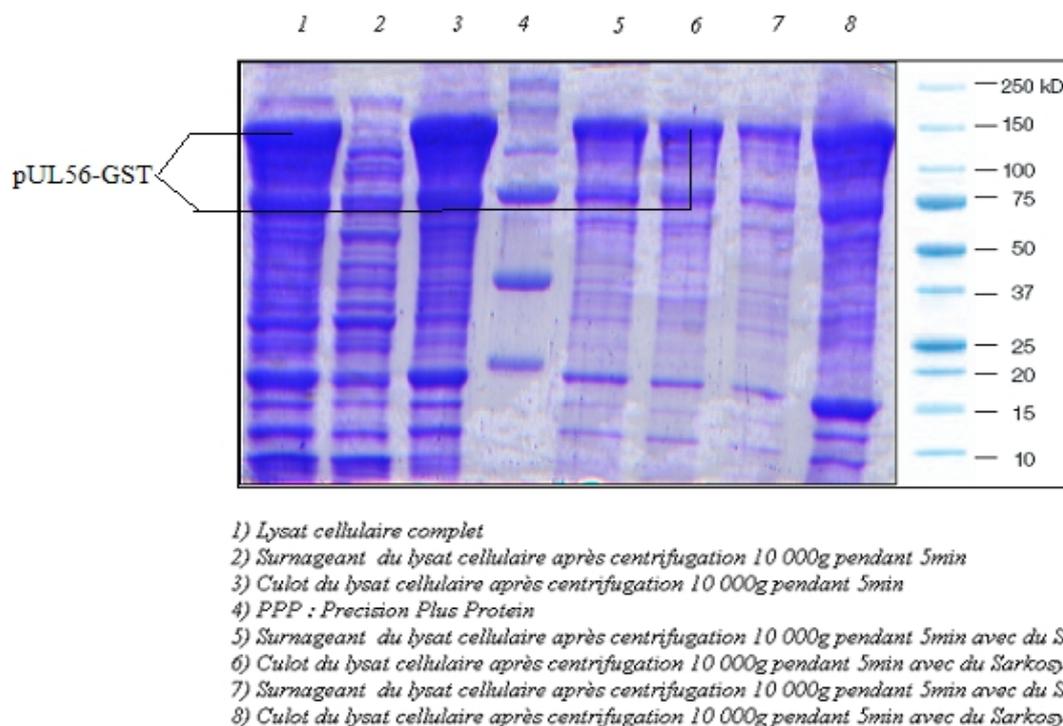


Figure 26 : Effet du sarkosyl sur la solubilité de la protéine UL56. Coloration au bleu de Coomassie sur gel d'acrylamide à 10%

Au final, nous avons donc choisi d'utiliser le tampon de lyse décrit par l'équipe de Bogner (Hwang *et al.*, 2002) associé à une sonication afin de solubiliser au maximum les agrégats

cellulaires avant de purifier le lysat obtenu à l'aide du kit MagneGST™ Protein Purification System (Promega) après adaptation des recommandations du fabricant (Annexe 1). Une concentration de glutathione de 100mM et un pH de 8,3 ont montré des résultats satisfaisants. L'analyse des protéines purifiées est effectuée par migration sur un gel de polyacrylamide à 12% et coloration au bleu de Coomassie (Figure 27-A). Le laboratoire ne disposant pas d'un anticorps directement dirigé contre la protéine pUL56 pour vérifier sa production par western blot, l'anticorps primaire utilisé est un anticorps anti-GST. Afin d'amplifier le signal de détection un anticorps secondaire anti-IgG couplé à l'HRP est utilisé. L'analyse par western blot confirme la présence de notre protéine d'intérêt dans l'éluât (Figure 27-B). Cependant la présence de bandes de taille inférieure laisse supposer que le produit de purification n'est pas totalement pur ou que des produits de dégradation de la protéine sont présents.

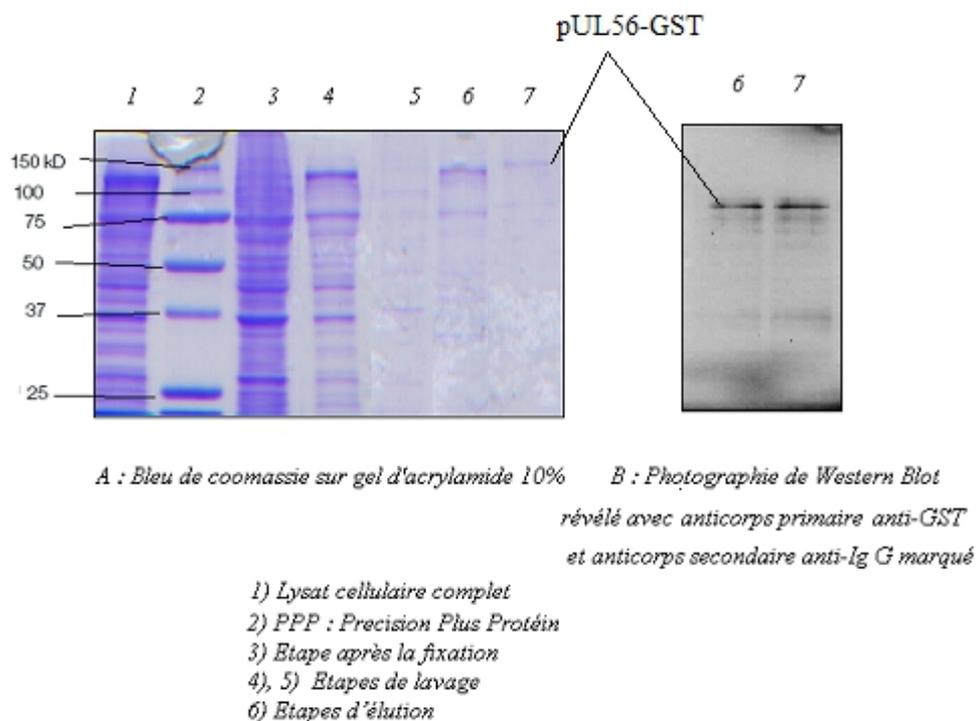
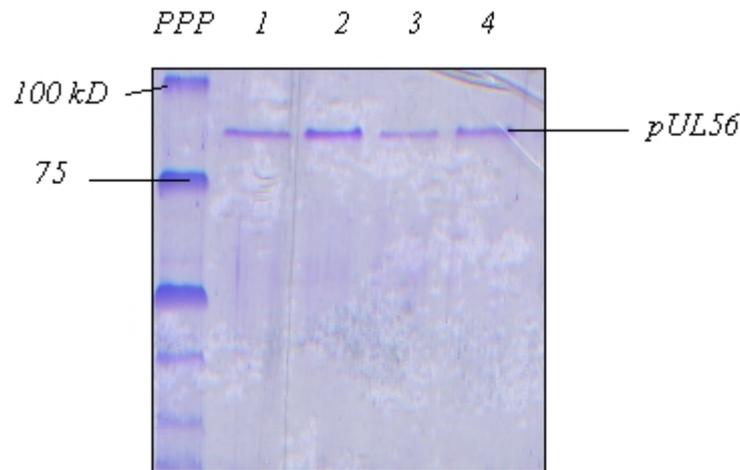


Figure 27: Etapes de la purification analysées sur gel de polyacrylamide 12% avec révélation au bleu de Coomassie et l'analyse des protéines produites par western blot. Les échantillons déposés dans les puits 1, 3, 4, 5, 6, et 7 correspondent aux produits obtenus après chaque étape de la purification d'un même échantillon. Sur la piste 3 a été déposé le lysat après fixation de la protéine aux billes magnétiques, ce qui explique la disparition de la bande supérieure d'un poids moléculaire d'environ 120kDa correspondant à celui de pUL56-GST. Le produit final d'éluat (pistes 6, 7) possède un poids moléculaire identique à celui de la protéine recombinante pUL56-GST.

Clivage de la GST

Après vérification de la purification sur gel de polyacrylamide, le clivage de la GST est réalisé, une fois les billes rincées avec le tampon de clivage, avec la PreScission Protease™ (Amersham) (Figure 27). A ce niveau il n'est plus possible de procéder à une vérification par western blot car la protéine est libérée de la GST et nous ne disposons pas d'anticorps spécifiques de pUL56.



Bleu de Coomassie sur gel d'acrylamide 10%

PPP : Precision Plus Protein

1), 2), 3), 4) : éluats après excision

Figure 28: Excision de la GST par clivage enzymatique avec la PreScission Protease™ (Amersham). Les dépôts sur les pistes 1, 2, 3, 4, sont issus de quatre purifications simultanées de pUL56. Les bandes sont à une taille attendue d'environ 90 kDa ce qui correspond à la taille d'un monomère de la protéine pUL56

Contrôle des produits purifiés en spectrométrie de masse

L'analyse en spectrométrie de masse peut s'effectuer en présence ou non de la GST encore liée à la protéine. Le spectromètre de masse permet un séquençage de la protéine et une identification par comparaison aux banques de données protéiques. Le séquençage a permis d'identifier quatre types de protéines différentes. Dans le Tableau 8, on peut observer que la protéine principale identifiée est la protéine pUL56.

| Protéine identifiée | Total | % de couverture | Nom | Espèce |
|---------------------|-------|-----------------|--|--|
| 1 | 28,88 | 50,235 | <i>protein UL56 (HFLF0 protein) - Human cytomegalovirus (strain AD169) (HHV-5) (Human herpesvirus 5)</i> | HCMV |
| 2 | 4,48 | 48,430 | <i>Structure Of Porcine Beta Trypsin With 0.01% Polydocanol</i> | Sus scrofa (Contaminant) |
| 3 | 3,36 | 23,757 | <i>cra hCP1609934.2 keratin 1 (epidermolytic hyperkeratosis)</i> | Homo sapiens (Contaminant) |
| 4 | 1,85 | 10.550 | <i>Glutathione S-transferase 26 kDa (EC 2.5.1.18) (GST class-mu) - Schistosoma japonicum (Blood fluke)</i> | Schistosoma japonicum (contaminant) |

Tableau 8: Tableau récapitulatif des résultats de l'analyse en spectrométrie de masse de la production de pUL56

Le total correspondant au « prot score » atteint une valeur de 28,88. Il est défini par sommation des peptides séquencés reliés à la même protéine. Cette valeur peut être qualifiée de très bonne. Le « prot score » est élevé lorsque le nombre de peptides bien séquencés est élevé. Le pourcentage de couverture atteint 50%. Cela signifie que plus de 50% de la protéine totale a été séquencé à partir des peptides obtenus par trypsination. La présence des autres protéines comme la trypsine, la kératine, et la GST s'explique de différentes façons. La trypsine est présente du faite de son utilisation pour la digestion enzymatique de la protéine. La kératine a été apportée lors des manipulations du gel par l'expérimentateur et la présence de la GST s'explique du fait que l'analyse a été réalisée sur un échantillon pour lequel la GST n'a pas été clivée.

La même analyse a été effectuée sur pUL89 et sur les fragments A, C, et F. Ces analyses ont confirmé qu'il s'agissait bien de pUL89, du fragment A et C. En revanche, le fragment F n'a pas pu être identifié.

Etude de l'interaction entre peptides/protéines en retard sur gel après cross-linking

Le *cross-linking* permet de rendre pérenne (covalente) une interaction entre deux peptides ou protéines en présence d'une molécule dite *cross-linker* qui va stabiliser cette interaction. A partir de nos fragments protéiques, l'interaction peut être testée entre la protéine UL56 entière, ou les fragments protéiques d'UL56 et pUL89(580-600), ou la protéine UL89 entière. Après *cross-linking*, et digestion protéasique, le fragment protégé par l'interaction peut être identifié en spectrométrie de masse. Le nombre d'amines libres (lysines et N-ter) de chaque protéine ou fragment détermine les conditions de *cross-linking*.

Dans un premier temps il a fallu déterminer les concentrations des différentes protéines et peptides en fonction de leur epsilon (ϵ) d'après la loi de Beer-Lambert.

$$DO = \epsilon \cdot l \cdot c$$

DO: Densité Optique à 280nm.

ϵ : coefficient d'extinction molaire (en $L \cdot mol^{-1} \cdot cm^{-1}$). Il dépend de la longueur d'onde, la nature chimique de l'entité et la température.

l : largeur de la cuve (1 cm).

c : concentration ($mol \cdot l^{-1}$).

Les epsilons sont déterminés à partir d'un site Internet: http://npsa-pbil.ibcp.fr/cgi-bin/npsa_automat.pl?page=/NPSA/npsa_compo.html.

Le site précédemment cité permet également de dénombrer le nombre d'amines primaires (lysines et N-ter) qui vont réagir avec le *cross-linker* ou BS3 (Bis-sulfosuccimidyl suberate).

Ce dernier est ajouté au dernier moment de manière à obtenir : [peptide] x [amines libres totales en solution] = [BS3] x 0,5 car le BS3 est bifonctionnel (il réagit avec 2 amines en même temps).

Les différents résultats sont présentés dans le Tableau 9.

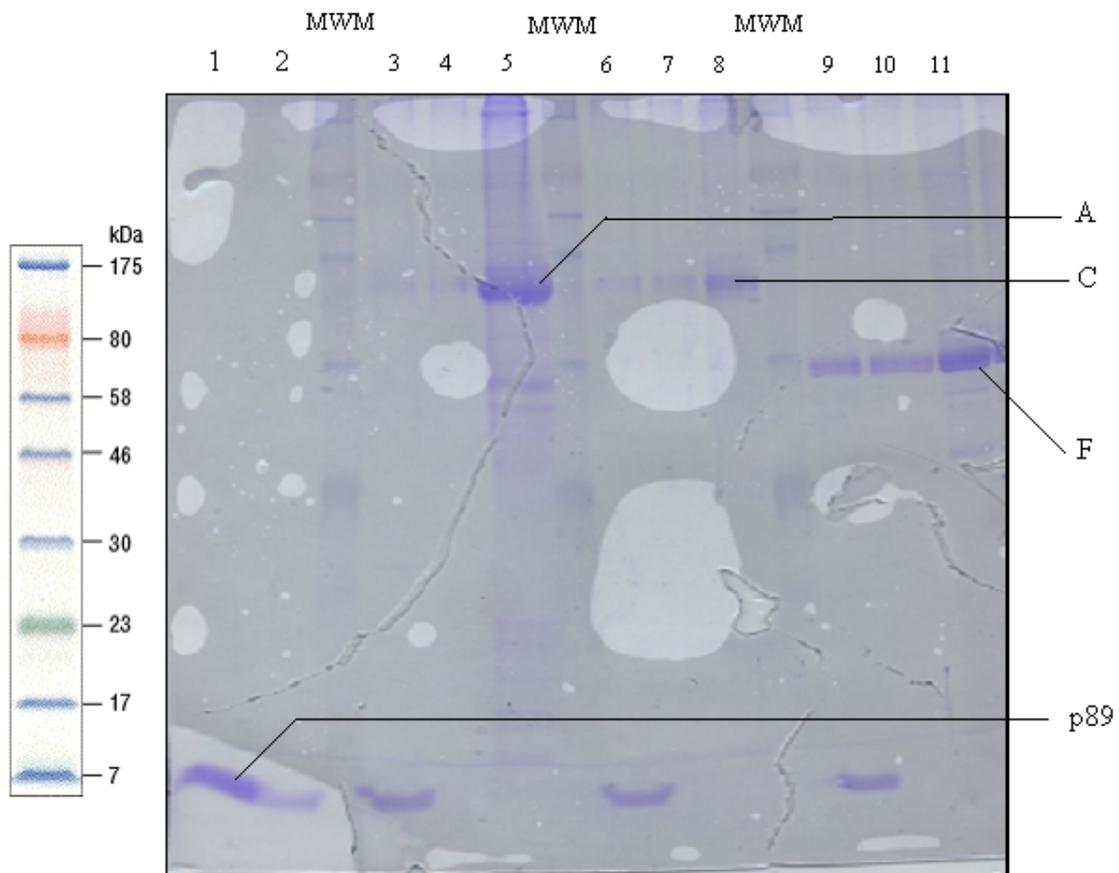
| Nom | Nombre amines libres | ϵ | Concentration (C ₁) | Concentration (C ₂) |
|----------------|----------------------|------------|---------------------------------|---------------------------------|
| A | 8 | 30 624 | 39,3 μ M | 39,3 μ M |
| C | 2 | 6 144 | 67 μ M | 50 μ M |
| F | 5 | 3 072 | 228 μ M | 50 μ M |
| pUL89(580-600) | 2 | 1 536 | 125 μ M | 50 μ M |

Tableau 9: Récapitulatif du nombre d'amines libres, des epsilons ainsi que des concentrations de chaque molécules déterminés après mesure de la DO à 280nm pour l'expérience de *cross-linking*

Une série de 11 tubes est préparée contenant soit le peptide A, C, F ou pUL89(580-600) seul ou avec du BS3 ou encore le peptide A, C, F + pUL89(580-600) + BS3. Les volumes et les concentrations des peptides sont précisés dans le Tableau 10.

| Puits | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 | 7 | 8 | 9 | 10 | 11 |
|----------------------------------|-------------|-------------|-------------|-------------|-------------|-------------|-------------|-------------|-------------|-------------|-------------|
| Peptide à 50 μ M | A | | 100 μ l | 100 μ l | 100 μ l | | | | | | |
| | C | | | | | 100 μ l | 100 μ l | 100 μ l | | | |
| | F | | | | | | | | 100 μ l | 100 μ l | 100 μ l |
| pUL89(580-600) à 50 μ M | | 100 μ l | 100 μ l | 100 μ l | | 100 μ l | | | 100 μ l | | |
| BS3 | | | 100 μ l | | 100 μ l | 100 μ l | |
| Tampon phosphate | 250 μ l | 150 μ l | 50 μ l | 150 μ l | 250 μ l | 50 μ l | 150 μ l | 250 μ l | 50 μ l | 150 μ l | 250 μ l |
| Nombre amines libres en solution | 3 | 3 | 12 | 9 | 9 | 6 | 3 | 3 | 9 | 6 | 6 |
| Concentration en BS3 en μ M | 75 | 75 | 300 | 225 | 225 | 150 | 75 | 75 | 225 | 150 | 150 |

Tableau 10: Composition des différents mélanges réactionnels de l'expérience de *cross-linking*.



Gel acrylamide 15% coloré au bleu de Coomassie.

MWM correspond au marqueur de poids moléculaire ColorPlus Prestained Protein Marker Broad Range (New England BioLabs).

- | | |
|---|---|
| <i>1) tube 1 contenant p89 seul</i> | <i>7) tube 7 contenant peptide C et BS3</i> |
| <i>2) tube 2 contenant p89 et BS3</i> | <i>8) tube 8 contenant peptide C seul</i> |
| <i>3) tube 3 contenant peptide A, p89, et BS3</i> | <i>9) tube 9 contenant peptide F, p89, et BS3</i> |
| <i>4) tube 4 contenant peptide A et BS3</i> | <i>10) tube 10 contenant peptide F et BS3</i> |
| <i>5) tube 5 contenant peptide A seul</i> | <i>11) tube 11 contenant peptide F seul</i> |
| <i>6) tube 6 contenant peptide C, p89, et BS3</i> | |

Figure 29 : Expérience de retard sur gel entre pUL89(580-600) et les peptides A, C, et F après *cross-linking* par le BS3

Les peptides pUL89(580-600), A, C, et F sont déposés seuls, respectivement piste 1, 5, 8 et 11 afin de déterminer leur profil de migration de référence (Figure 29). Piste 2, l'échantillon déposé contient le peptide pUL89(580-600) et du BS3 tout comme les échantillons 4, 7, et 10

contiennent du BS3 et respectivement les peptides A, C, et F. Ces mélanges réactionnels servent à vérifier que les peptides ne s'homodimérisent pas entre eux et que le BS3 n'induit pas de modifications du profil de migration. Aux vues des résultats ceci n'est pas le cas. Dans les échantillons 3, 6, 9, le peptide pUL89(580-600) est mis en présence respectivement du peptide A, C, F et de BS3. Dans l'hypothèse d'une interaction entre pUL89(580-600) et les peptides A, C ou F, un retard sur gel objectivé par la présence de bande d'un poids moléculaire supérieur à celui des peptides aurait du être observé ainsi qu'éventuellement une disparition de la bande correspondant à pUL89(580-600) . Cependant l'expérience n'a pas permis d'obtenir des résultats significatifs.

L'expérience de retard sur gel n'ayant pas donnée de résultats concluant, celle-ci a été recommencée en multipliant les concentrations de BS3 par 100. Là également, l'expérience n'a pas donné de résultats satisfaisants.

Afin d'identifier les interactions mises en jeu lors du processus d'encapsulation, il est nécessaire dans un premier temps de produire les protéines pUL56 et pUL89 mais également de pouvoir les purifier en quantité suffisamment importante afin de réaliser les expériences de retard sur gel et les études de structure en RMN. L'essentiel de notre travail a consisté à optimiser les rendements de production et de purification des différents peptides et protéines. Après purification, une surexpression des protéines et des fragments a bien été mise en évidence. Cependant la concentration finale de la protéine pUL56 obtenue après purification est largement insuffisante pour permettre des analyses de structure en RMN. Il a alors été envisagé de multiplier les expériences de production et de purification puis de pooler l'ensemble des protéines après élution. L'inconvénient majeur de cette stratégie est la dilution de pUL56 ce qui implique une étape supplémentaire de concentration. Mais cette étape peut entraîner une perte de protéines et un risque supplémentaire de contaminer les échantillons par des protéases.

L'analyse en spectrométrie de masse est une très bonne méthode de contrôle des protéines. Elle a permis de confirmer que les protéines produites étaient bien celles attendues. Cependant cette méthode comporte certains inconvénients. Tout d'abord il faut que la quantité de protéine présente dans le gel soit suffisamment importante. En effet lors de la vérification de pUL56, des problèmes ont été rencontrés. La protéine étant de taille très importante, elle occupe beaucoup de place sur le gel d'acrylamide. De ce fait pour un volume de gel donné il y

a très peu de protéines présentes par rapport à la quantité de matrice et le matériel se trouve en quantité insuffisante pour l'analyse. De plus l'analyse du fragment F ne s'est pas révélée concluante. L'hypothèse avancée est que le fragment F étant de taille très petite (42 acides aminés), les peptides générés par trypsination sont de taille trop petite pour être détectés par le spectromètre. Parallèlement, une vérification de la séquence nucléotidique du clone utilisé pour la production a permis de vérifier que la séquence du fragment F est encore présente dans le vecteur, en phase avec la séquence de la GST, devant permettre une traduction correcte du peptide F.

Les expériences de retard sur gel n'ont pas donné de résultats concluants ; pour une raison de temps elles n'ont pu être réitérées. Plusieurs hypothèses ont été avancées pour expliquer cet échec. En premier il serait intéressant augmenter les concentrations en peptides. En effet l'équipe de S. Bouaziz réalise cette expérience en faisant une analyse par chromatographie liquide haute pression (HPLC). Cette méthode étant plus sensible que la méthode SDS-PAGE, une concentration plus forte des peptides, peut-être 100 μ M, permettrait de rendre visible les interactions en bleu de Coomassie. Ceci pose alors le problème des quantités importantes de peptides à purifier. On peut éventuellement envisager que le tampon phosphate ne serait pas le plus adapté pour ce type d'expérience. Pour l'instant le choix d'un tampon de substitution n'a pas été arrêté. Une étape de dénaturation thermique avant le dépôt sur gel est aussi à envisager.

A l'issue de la production et de la purification de ces protéines/peptides, il conviendra de s'assurer également du caractère fonctionnel de ces protéines. Pour cela, nous envisageons de développer des tests fonctionnels tels que la mesure de l'activité ATPasique de pUL56.

Publication 5: Prédiction de nouveaux domaines fonctionnels de la protéine pUL89 du cytomégalo­virus humain et modélisation tridimensionnelle du site catalytique DEXDc

New functional domains of human cytomegalovirus pUL89 predicted by sequence analysis and three-dimensional modelling of the catalytic site DEXDc.

Gaël Champier, Sébastien Hantz, Anthony Couvreur, Stéphanie Stuppler,
Marie-Christine Mazon, Serge Bouaziz, François Denis, Sophie Alain.

Antiviral Therapy. 2007 ; 12 : 217-232

Après avoir émis des hypothèses quant à la prédiction de structure et les relations structure-fonction de pUL56, nous avons souhaité nous intéresser à la protéine partenaire pUL89, grande sous-unité du complexe terminase, intervenant également dans l'encapsidation de l'ADN viral. Peu de données sont disponibles quant à sa fonction réelle, mais sa conservation chez les herpesvirus 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, 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 herpesvirus 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 herpesvirus humains et animaux pour identifier les domaines fonctionnels importants.

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.

Par alignement de la séquence de pUL89 avec celle de 17 homologues d'herpèsvirus humains et animaux, nous avons décrit 12 régions conservées, que nous avons nommées régions conservées I à XII.

L'analyse de la séquence de ces régions nous a permis d'identifier des domaines fonctionnels potentiellement impliqués dans les activités ATPasique et endonucléasique et dans l'interaction avec la capsidie 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*).

Concernant 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.

Quant à l'interaction avec la capsidie, nous avons identifié deux domaines probablement impliqués dans l'interaction de pUL89 avec la protéine portail de la capsidie 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, 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 de ce site sur la fonction de la protéine.

Publication 6 : Prédiction de structure du domaine C-terminal de la protéine pUL89 du complexe terminase du cytomégalo virus humain.

Insight into the C-terminal domain structure of pUL89 from human cytomegalovirus terminase complex.

Anthony Couvreur, Sébastien Hantz, Marquant Rodrigue, Gaël Champier,
Sophie Alain, Morellet Nelly, Serge Bouaziz,

Proteins : Structure, Function and Bioinformatics. (soumis)

Parallèlement à nos travaux sur la définition des différents domaines fonctionnels et la modélisation du site catalytique de pUL89, les travaux de Thoma et coll. ont démontré que le domaine d'interaction minimal nécessaire entre pUL89 et pUL56 correspondait au peptide 580-600 de pUL89 (Thoma *et al.*, 2006). A ce jour, le domaine complémentaire d'interaction de pUL56 n'a toujours pas été mis en évidence. Cette interaction étant nécessaire au bon fonctionnement du complexe terminase, elle constitue une cible idéale pour le développement d'un antiviral. Nous avons donc choisi de nous intéresser plus particulièrement à la structure de cette zone d'interaction et plus largement du domaine C-terminal de pUL89 grâce à deux approches complémentaires : l'une portant sur l'étude structurale du peptide 580-600 de pUL89 par résonance magnétique nucléaire (RMN) et l'autre portant sur la modélisation du domaine 457-612 de pUL89 grâce à des modèles théoriques.

Les peptides pUL89(580-600) et pUL89(568-635) ont été obtenus par synthèse automatique et purifiés par HPLC puis analysés par RMN avec différentes conditions de solubilisation. Le peptide pUL89(568-635) englobe le domaine conservé XI que nous avons décrit dans notre

précédente étude (Champier *et al.*, 2007). Les données brutes sont ensuite interprétées à l'aide de logiciels spécifiques. Quant aux structures secondaires, elles ont été prédites à l'aide du programme PSI-PRED. Le logiciel MUSTER a permis ensuite de rechercher les 10 séquences protéiques ayant un profil de structure secondaire le plus proche de celui du domaine pUL89(457-612). Les séquences ont ensuite été réalignées manuellement afin de faire coïncider, d'une part, les résidus impliqués dans les motifs de liaison aux ions métalliques et, d'autre part, les prédictions de structure secondaire. Les structures secondaires observées expérimentalement par RMN du segment pUL89(568-612) ont été imposées au modèle théorique à l'exception de la partie C-terminale de ce peptide (acides aminés 616 à 635) qui n'a pas été incluse dans l'alignement par absence de séquences correspondante dans le modèle. La qualité des structures a été évaluée par le programme QMEANclust qui calcule un score incluant divers paramètres biophysiques de la structure protéique. L'ensemble des figures a été réalisé à l'aide du logiciel PyMol.

L'étude en RMN des peptides d'intérêts a montré que la structuration de ces peptides était de meilleure qualité en milieu hydrophobe que dans l'eau. Ainsi, le peptide pUL89(580-600) présente une structure en hélice α . Quant à l'analyse du peptide pUL89(568-635) qui comporte le domaine conservé XI, elle nous a permis de confirmer la présence d'une hélice α au niveau des acides aminés Asp⁵⁸² à Phe⁵⁹⁴ et de décrire trois autres hélice α , la première en amont du peptide 580-600 (Pro⁵⁷⁵-Gly⁵⁸⁰) et les deux autres en aval (Asn⁵⁹⁶-Ile⁶¹⁰ et Pro⁶¹⁶-Leu⁶³²). Malgré l'élargissement en N- et C-terminal du peptide pUL89(580-600), il ne nous a pas été possible d'établir par RMN la structure tertiaire de ce domaine.

Dans ce contexte, nous avons souhaité construire un modèle théorique contenant le peptide pUL89(580-600) du domaine (pUL89-endo) situé entre les acides aminés 456 et 615, qui comprend toutes les configurations nécessaires à l'activité endonucléasique. Cette approche a été choisie car la longueur de ce domaine le rend inaccessible à une exploration RMN et son expression à grande échelle en système bactérien pour une exploration aux rayons X n'a pas été possible. Ce modèle est basé sur l'homologie de structure avec la RNase HI identifiée à l'aide du serveur MUSTER. Les restrictions physiques obtenues par RMN ont été appliquées au modèle. Nos résultats démontrent un double rôle de l'hélice 580-600 : dans l'activité endonucléasique et dans l'interaction avec pUL56. Concernant l'activité endonucléasique, la triade acide Asp⁴⁶³, Glu⁵³⁴ et Glu⁵⁸⁸ constitue le centre du site actif. Une structure théorique de pUL89-endo en complexe avec un duplex hybride ARN/ADN a permis d'expliquer un grand nombre de conservations et de localisation physico-chimique d'acides aminés impliqués dans la liaison à l'ADN et le clivage.

Ainsi, bien que ce modèle soit théorique, il permet d'expliquer comment pUL89 peut catalyser la coupure de l'ADN et comment pUL56 peut influencer ce mécanisme en se liant à sa partenaire. D'après ce modèle, l'hélice pUL89(580-600) ainsi que d'autres parties du domaine permettent de positionner la 4^e hélice et la boucle qui la précède afin de pouvoir lier l'ADN pour le clivage.

Ces hypothèses devront être confirmées par des études de biochimie et de structure afin de clarifier comment pUL89 et pUL56 s'associe pour constituer le complexe terminase actif. La compréhension de cette interaction est un élément indispensable au développement d'antiviraux ciblant cette étape afin de leur garantir une spécificité maximale.

Discussion et perspectives

L'infection à cytomégalovirus demeure un véritable fléau chez les patients transplantés d'organe ou de cellules souches hématopoïétiques malgré l'existence d'antiviraux. En effet, au-delà de leur efficacité, ces molécules ne sont pas dénuées d'effets secondaires et elles peuvent, en outre, conduire à l'émergence de résistances. Ce phénomène participe à l'augmentation du nombre d'épisodes virémiques symptomatiques ou asymptomatiques débouchant généralement sur des maladies à CMVH ou sur le rejet du greffon avec une élévation du risque de décès (Bhorade *et al.*, 2002). Il est donc indispensable 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.

La détection des souches résistantes repose sur deux approches complémentaires :

- les techniques phénotypiques permettent de mesurer le niveau de résistance et d'évaluer la capacité répliquative de la souche responsable de l'infection, mais elles nécessitent l'isolement de la souche à étudier et des délais importants pour obtenir un stock viral suffisant, ce qui en fait une technique non adaptée au suivi des patients transplantés. Cependant, elle demeure la technique de référence pour la caractérisation d'une souche.
- l'approche génotypique permet, quant à elle, de rendre une réponse rapide au clinicien puisqu'elle est basée sur l'amplification et l'analyse de séquence des gènes cibles des antiviraux actuels (*UL97* et *UL54*) et ce, à partir de n'importe quel type de prélèvement. Son utilisation est rendue possible grâce à la forte corrélation entre le phénotype de résistance et le génotype.

Afin de pouvoir détecter les mutations de résistance d'une souche de CMV d'un patient transplanté et rendre ce résultat le plus rapidement possible pour qu'il puisse être utilisable pour l'adaptation thérapeutique, nous avons souhaité développer au laboratoire une **technique fiable et rapide de génotypage des gènes *UL97* (Alain *et al.*, 2004) et *UL54* dans leur intégralité**. Ce choix présente l'avantage de pouvoir détecter toute nouvelle mutation qui émergerait sous traitement antiviral contrairement à d'autres techniques qui détectent seulement les mutations les plus fréquemment retrouvées et déjà répertoriées dans la littérature (Gohring *et al.*, 2008). Les méthodes de génotypage que nous avons développées,

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. L'analyse des séquences repose sur le programme GeneLibrarian du logiciel GeneObject3.2™ (Bayer) qui utilise des banques de données que nous avons constituées. Ce programme a la capacité d'**aligner directement les séquences** 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.

Grâce à ces techniques, nous pouvons détecter les mutations de résistance déjà décrites mais également toute nouvelle mutation dont l'imputabilité dans la résistance reste à prouver. A cette fin, il faut utiliser des techniques de transfert de marqueur qui consistent à transférer la mutation à une souche sauvage de référence et à mesurer l'impact de cette mutation sur la résistance de la souche de référence. 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 *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. Après avoir détecté la délétion 601 de la souche de CMVH d'un patient transplanté, nous avons utilisé cette méthode en collaboration avec les Pr Michel et Mertens de l'Université de Ulm (Allemagne) afin de démontrer son implication dans la résistance au GCV. Cependant, comme toute autre technique de phénotypage, la durée de réalisation n'est pas compatible pour une utilisation en routine.

En pratique quotidienne, lorsqu'une nouvelle mutation est détectée, on peut ainsi inclure une interprétation systématique de ces résultats d'après les données de la littérature et nos connaissances acquises lors des études fondamentales sur les protéines cible des antiviraux. Cette approche globale de la résistance est actuellement utilisée dans notre laboratoire, en partenariat avec le laboratoire de Virologie de Lariboisière du Dr Mazon, pour la surveillance de la résistance du CMV dans le cadre du Centre National de Référence des Cytomégalovirus (CNR CMV).

Parallèlement à l'étude des mutations de résistance sur le plan fondamental, nous avons souhaité évaluer la prévalence et l'évolution de ces mutations dans la population des transplantés français. Ce travail a été réalisé dans le cadre d'un PHRC interrégional : « Résistance du cytomégalovirus aux antiviraux après transplantation d'organe et greffe de moelle, à l'ère de la prophylaxie » mené par le CNR Cytomégalovirus qui regroupe 33 centres et a permis d'inclure plus de 500 patients à ce jour dès le premier épisode de virémie à CMV. L'objectif a été de suivre ensuite l'évolution de l'infection à CMV chez ces patients en fonction de leur traitement antiviral, immunosuppresseur et de divers paramètres que nous avons pu collecter. Contrairement aux études d'efficacité de molécules antivirales (Boivin *et al.*, 2009), cette étude a évalué la **prévalence des mutations de résistance à un taux plus élevé (5,2%)** et n'a pas retrouvé certains facteurs de risque d'émergence de résistance classiquement décrits, tels que la durée prolongée de traitement ou la charge virale élevée (Limaye, 2002). **La majorité des mutations que nous avons détectées correspondent à des mutations de résistance déjà décrites dans la littérature** (Chou, 2008) (Ducancelle *et al.*, 2006b). Cependant, nous avons observé un **nombre important de mutations dans pUL54 par rapport à ce qui est habituellement rapporté**. Parmi elles, certaines n'ont jamais été décrites dans la littérature. Ce phénomène vient d'être également rapporté par Boivin et coll. dans une étude sur une population de 275 patients transplantés d'organe solide ayant reçu une prophylaxie par Val-GCV (Boivin *et al.*, 2009). Toutes ces mutations devront être explorées pour connaître leur impact sur la résistance. Un des principaux avantages de notre étude est de **suivre en temps réel les patients transplantés**, ce qui représente une vision non biaisée de l'évolution des résistances en fonction des différentes pratiques de chaque centre. Nous envisageons de prolonger la durée de suivi de ces transplantés afin de pouvoir observer l'évolution de l'infection à CMV et des résistances aux antiviraux sur plusieurs années de transplantation pour un patient donné dans le cadre d'une cohorte pérenne.

Comme nous l'avons vu au cours de ce protocole, de nouvelles mutations sont donc caractérisées régulièrement et nous avons le projet de constituer une base de données consignant les mutations des gènes *UL97* et *UL54*. Il s'agit d'organiser la mise à jour régulière (par exemple annuelle) de la base de données existante de manière à la rendre disponible à tout laboratoire qui pourrait en avoir besoin. Avec à terme la mise en place d'une base de données européenne intégrant régulièrement les mutations nouvellement décrites dans la littérature ou identifiées par le CNR. Elle sera mise à disposition sur le site internet du CNR.

Toutefois, cette approche ne permet pas 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**.

Afin de mieux comprendre la corrélation entre mutations et structure-activité, nous avons dans un premier temps étudié le polymorphisme naturel et les régions conservées de ces protéines avant la mise sur le marché des dérivés benzimidazolés. Les objectifs de cette étude sont, à court terme, de faciliter l'identification des résistances vis à vis de ces molécules une fois qu'elles seront utilisées pour le traitement des infections à CMV (essentiellement le MBV) et à plus long terme, d'améliorer la compréhension de la fonction des protéines cibles pour faciliter le développement de nouvelles molécules.

Sur le modèle de pUL97, nous avons tout d'abord développé des outils rapides et standardisables de **génotypage des gènes *UL27*, *UL56* et *UL89*** et 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 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 pUL27, pUL56 et pUL89 avec celle de leurs homologues chez les herpèsvirus humains et animaux afin d'identifier 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. Quant à pUL27, une étude récente a montré que cette protéine ne serait pas une cible directe du MBV (Chou, 2009) comme cela avait été suggéré antérieurement. L'analyse des régions conservées nous a conduit à émettre l'hypothèse d'une zone d'interaction caractérisée par une structure en hélice α et de conclure que **pUL27 interviendrait dans la régulation de l'activité de pUL97 et non comme cible directe du MBV.**

Concernant pUL56, nous avons ainsi montré qu'elle appartient à la **classe des "DNA junction resolvases"** puisqu'elle possède un domaine fonctionnel, que nous avons nommé pUL56-ZF (*pUL56 zinc finger*), qui correspond au site catalytique endonucléasique de cette classe de recombinases (Champier *et al.*, 2008). 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 des **motifs en leucine-zipper seraient également présents sur pUL56** et pourraient être impliqués dans la dimérisation de pUL56 tandis que pUL56 ZF constituerait le site catalytique endonucléasique du complexe terminase et le site de fixation et de reconnaissance des séquences *pac*. 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 (Dittmer, 2005), une inhibition de la reconnaissance spécifique des séquences *pac* par pUL56-ZF, provoquant une perturbation de l'activité nucléasique (McVoy *et al.*, 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).

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 *et al.*, 2002). Nous avons par ailleurs décrit des domaines probablement impliqués dans l'interaction avec l'ADN et dans l'activité nucléasique. 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.**

La fragment de pUL89 (acides aminés 580 à 600) intervenant dans la liaison avec pUL56 ayant été mis en évidence (Thoma *et al.*, 2006), il nous a semblé intéressant de définir la structure de ce peptide puis d'essayer de déterminer avec quel domaine de pUL56 il interagit. Pour cela, pUL89(580-600) ainsi qu'un fragment plus long ont été synthétisés par l'équipe de Serge Bouaziz puis analysés en RMN. Après avoir testé différents milieux de solubilisation, il s'avère que ce peptide présenterait une structure en hélice α . Une modélisation du domaine situé entre les acides aminés 456 et 615, incluant le peptide pUL89(580-600), a montré qu'il comprend toutes les configurations nécessaires à l'activité endonucléasique.

Parallèlement à ces travaux, nous avons souhaité produire différents fragments de pUL56 pouvant potentiellement interagir avec pUL89. A ce jour, le domaine de pUL56 n'ayant toujours pas été isolé, des travaux complémentaires doivent être entrepris.

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. De nombreuses régions conservées de ces protéines restent encore à explorer, notamment par 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, permettant de déterminer les fonctions de ces différentes régions et d'identifier les résidus indispensables à ces fonctions. Ainsi, sur la base de solides connaissances sur le fonctionnement du complexe terminase, les dérivés benzimidazolés existants pourront être améliorés et de nouvelles molécules pourront être élaborées.

Notre objectif est de disposer à terme d'un nouvel outil permettant de générer des virus recombinants à haute fréquence permettant d'étudier l'ensemble des protéines cibles des antiviraux actuellement utilisés en clinique ou en cours de développement, en l'appliquant en priorité aux terminases pUL56 et pUL89. La technique qui paraissait la plus adaptée à nos besoins est basée sur l'utilisation de chromosome bactérien artificiel « Bacterial Artificial

Chromosome » (BAC) dans lequel est cloné le génome du CMVH. Cette technique permet en effet de manipuler le génome du CMVH cloné dans un plasmide qui est transfecté dans une souche d'*E. coli* permettant les recombinaisons. Les manipulations du génome du CMVH sont de cette façon réalisées à l'aide de la « machinerie » procaryote se dispensant ainsi de la lourdeur de la machinerie eucaryote nécessaire à la réplication virale. Cet outil permettrait également de tester rapidement l'implication de nouvelles mutations dans la résistance du CMVH aux antiviraux actuellement utilisés (GCV, CDV, PFA, MBV) en produisant des virions recombinants porteurs de ces mutations pour effectuer une analyse phénotypique de ces souches recombinantes.

Conclusion

La résistance du cytomégalo­virus aux anti­viraux repose sur l'émergence de mutations au niveau des protéines cibles de ces anti­viraux. L'étude de la résistance a donc nécessité le développement de techniques de génotypage standardisées, rapides, fiables et reproductibles, des gènes de ces protéines cibles. Ces outils ont été conçus pour être utilisés dans l'activité diagnostique de routine du laboratoire pour ce qui concerne les gènes cibles de anti­viraux inhibiteurs de l'ADN polymérase. Le développement de nouveaux anti­viraux devenant de plus en plus indispensable devant des situations d'impasse thérapeutique chez les patients transplantés fortement immunodéprimés, ces outils ont été ensuite appliqués à l'étude des protéines du complexe terminase, cibles de nouveaux anti­viraux, les dérivés benzimidazolés.

Il est apparu indispensable de compléter le recensement de mutations connues ou nouvelles par une approche plus fondamentale reposant sur la prédiction de structure des domaines conservés des protéines pUL27, pUL56 et pUL89. Cette analyse de structure a permis de mieux définir les fonctions et les interactions de ces différentes protéines, en s'appuyant sur les rapports étroits existant entre la structure et la fonction. Des expérimentations permettant la production de tout ou partie de ces protéines sont en cours afin de permettre une étude cristallographique de pUL56 et pUL89 dans le laboratoire Dr Serge Bouaziz de l'Institut de Pharmacologie Chimique et Génétique de l'Université Paris V, avec qui nous collaborons depuis plusieurs années. Parallèlement, nous devrions acquérir la technologie des BAC (*Bacterial Artificial Chromosome*) dans le laboratoire du Pr Messerle à l'université de Hanovre (Allemagne) afin de construire des virus recombinants porteurs de mutations pour l'étude des nouvelles mutations de résistance ou des protéines du complexe terminase.

Nos travaux ont donc une double orientation, pratique et concrète visant à détecter rapidement les mutations affectant l'activité des molécules anti­cytomégalo­virus pour une meilleure prise en charge thérapeutique des transplantés et plus fondamentale, permettant une meilleure compréhension des relations structure­fonction avec acquisition de nouvelles techniques dans le cadre de coopérations nationale et internationales.

Bibliographie

Adler S.P., Hempfling S.H., Starr S.E., Plotkin S.A. Riddell S. Safety and immunogenicity of the Towne strain cytomegalovirus vaccine. *Pediatr Infect Dis J*, 1998, 17, 200-6.

Adler S.P., Nigro G. Pereira L. Recent advances in the prevention and treatment of congenital cytomegalovirus infections. *Semin Perinatol*, 2007, 31, 10-8.

Alain S., Hantz S. Denis F. La quantification du cytomégalovirus en pratique. *Spectra Biologie*, 2008, 166, 38-44.

Alain S., Hantz S., Scieux C., Karras A., Mazon M.C., Szlag J.C., *et al.* Detection of ganciclovir resistance after valganciclovir-prophylaxis in renal transplant recipients with active cytomegalovirus infection. *J Med Virol*, 2004, 73, 566-73.

Alain S., Honderlick P., Grenet D., Stern M., Vadam C., Sanson-Le Pors M.J., *et al.* Failure of ganciclovir treatment associated with selection of a ganciclovir-resistant cytomegalovirus strain in a lung transplant recipient. *Transplantation*, 1997, 63, 1533-6.

Allice T., Enrietto M., Pittaluga F., Varetto S., Franchello A., Marchiaro G., *et al.* Quantitation of cytomegalovirus DNA by real-time polymerase chain reaction in peripheral blood specimens of patients with solid organ transplants: comparison with end-point PCR and pp65 antigen test. *J Med Virol*, 2006, 78, 915-22.

Anders D.G. McCue L.A. The human cytomegalovirus genes and proteins required for DNA synthesis. *Intervirology*, 1996, 39, 378-88.

Appleton B.A., Brooks J., Loregian A., Filman D.J., Coen D.M. Hogle J.M. Crystal structure of the cytomegalovirus DNA polymerase subunit UL44 in complex with the C terminus from the catalytic subunit. Differences in structure and function relative to unliganded UL44. *J Biol Chem*, 2006, 281, 5224-32.

Asberg A., Humar A., Rollag H., Jardine A.G., Mouas H., Pescovitz M.D., *et al.* Oral valganciclovir is noninferior to intravenous ganciclovir for the treatment of cytomegalovirus disease in solid organ transplant recipients. *Am J Transplant*, 2007, 7, 2106-13.

Baek M.C., Krosky P.M. Coen D.M. Relationship between autophosphorylation and phosphorylation of exogenous substrates by the human cytomegalovirus UL97 protein kinase. *J Virol*, 2002a, 76, 11943-52.

Baek M.C., Krosky P.M., He Z. Coen D.M. Specific phosphorylation of exogenous protein and peptide substrates by the human cytomegalovirus UL97 protein kinase. Importance of the P+5 position. *J Biol Chem*, 2002b, 277, 29593-9.

Baek M.C., Krosky P.M., Pearson A. Coen D.M. Phosphorylation of the RNA polymerase II carboxyl-terminal domain in human cytomegalovirus-infected cells and in vitro by the viral UL97 protein kinase. *Virology*, 2004, 324, 184-93.

Baldanti F., Silini E., Sarasini A., Talarico C.L., Stanat S.C., Biron K.K., *et al.* A three-nucleotide deletion in the UL97 open reading frame is responsible for the ganciclovir resistance of a human cytomegalovirus clinical isolate. *J Virol*, 1995, 69, 796-800.

Baldanti F., Underwood M.R., Simoncini L., Sarasini A., Biron K.K. Gerna G. The Cys607Tyr change in the UL97 phosphotransferase confers ganciclovir resistance to two human cytomegalovirus strains recovered from two immunocompromised individuals. *Antimicrob. Agents Chemother*, 1998, 42, 444-6.

Batadaram K., Dabrowski C. Schaffer P. 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.*, 1994, 68, 4251-61.

Beard P.M., N. S. Taus, and J. D. Baines. 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.*, 2002, 76, 4785-91.

Bernad A., Blanco L., Lazaro J.M., Martin G. Salas M. A conserved 3'----5' exonuclease active site in prokaryotic and eukaryotic DNA polymerases. *Cell*, 1989, 59, 219-28.

Bhorade S.M., Lurain N.S., Jordan A., Leischner J., Villanueva J., Durazo R., *et al.* Emergence of ganciclovir-resistant cytomegalovirus in lung transplant recipients. *J Heart Lung Transplant*, 2002, 21, 1274-82.

Biron K.K., Harvey R.J., Chamberlain S.C., Good S.S., Smith A.A., Davis M.G., *et al.* Potent and selective inhibition of human cytomegalovirus replication by 1263W94, a Benzimidazole L-Ribonucleoside with a unique mode of action. *Antimicrobial. Agents Chemother.*, 2002, 46, 2365-73.

Biron K.K., Stanat S., Sorrel J.B., Fyfe J.A., Keller P.M., Lambe C.U., *et al.* 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*, 1985, 82, 2473-77.

Boeckh M. Management of cytomegalovirus infections in blood and marrow transplant recipients. *Adv Exp Med Biol*, 1999, 458, 89-109.

Boeckh M. Ljungman P. How we treat CMV in hematopoietic cell transplant recipients. *Blood*, 2009, 113, 5711-19.

Bogner E. Human cytomegalovirus terminase as a target for antiviral chemotherapy. *Rev. Med. Virol.*, 2002, 12, 115-127.

Bogner E., K. R. F. S.M. The gene product of Human cytomegalovirus open reading frame *UL56* binds the *pac* motifs and has specific nuclease activity. *J. Virol*, 1998, 72, 2259-2264.

Boivin G., Gilbert C., Gaudreau A., Greenfield I., Sudlow R. Roberts N.A. 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*, 2001, 184, 1598-602.

Boivin G., Gilbert C., Morissette M., Handfield J., Goyette N. Bergeron M.G. A case of ganciclovir-resistant cytomegalovirus (CMV) retinitis in a patient with AIDS: longitudinal molecular analysis of the CMV viral load and viral mutations in blood compartments. *Aids*, 1997, 11, 867-73.

Boivin G., Goyette N., Rollag H., Jardine A.G., Pescovitz M.D., Asberg A., *et al.* Cytomegalovirus resistance in solid organ transplant recipients treated with intravenous ganciclovir or oral valganciclovir. *Antivir Ther*, 2009, 14, 697-704.

Bourgeois C., Sixt N., Bour J.B. Pothier P. Value of a ligase chain reaction assay for detection of ganciclovir resistance-related mutation 594 in *UL97* gene of human cytomegalovirus. *J. Virol. Methods*, 1997, 67, 167-75.

Boutolleau D., Deback C., Bressollette-Bodin C., Varnous S., Dhedin N., Barrou B., *et al.* Resistance pattern of cytomegalovirus (CMV) after oral valganciclovir therapy in transplant recipients at high-risk for CMV infection. *Antiviral Res*, 2009, 81, 174-9.

Bridges K.G., Hua Q., Brigham-Burke M.R., Martin J.D., Hensley P., Dahl C.E., *et al.* Secondary structure and structure-activity relationships of peptides corresponding to the subunit interface of herpes simplex virus DNA polymerase. *J Biol Chem*, 2000, 275, 472-8.

Caliendo A.M., Yen-Lieberman B., Baptista J., Andersen J., Crumpacker C., Schuurman R., *et al.* Comparison of molecular tests for detection and quantification of cell-associated cytomegalovirus DNA. *J Clin Microbiol*, 2003, 41, 3509-13.

Cannon M.J. Davis K.F. Washing our hands of the congenital cytomegalovirus disease epidemic. *BMC Public Health*, 2005, 5, 70.

Cha T.A., Tom E., Kemble G.W., Duke G.M., Mocarski E.S. Spaete R.R. Human cytomegalovirus clinical isolates carry at least 19 genes not found in laboratory strains. *J Virol*, 1996, 70, 78-83.

Chambers J., Angulo A., Amaratunga D., Guo H., Jiang Y., Wan J.S., *et al.* DNA microarrays of the complex human cytomegalovirus genome: profiling kinetic class with drug sensitivity of viral gene expression. *J Virol*, 1999, 73, 5757-66.

Champier G., Couvreur A., Hantz S., Rametti A., Mazon M.C., Bouaziz S., *et al.* Putative functional domains of human cytomegalovirus pUL56 involved in dimerization and benzimidazole D-ribonucleoside activity. *Antivir Ther*, 2008, 13, 643-54.

Champier G., Hantz S., Couvreur A., Stuppfler S., Mazon M.C., Bouaziz S., *et al.* New functional domains of human cytomegalovirus pUL89 predicted by sequence analysis and three-dimensional modelling of the catalytic site DEXDc. *Antivir Ther*, 2007, 12, 217-32.

Chee M.S., Bankier A.T., Beck S., Bohni R., Brown C.M., Cerny R., *et al.* Analysis of the protein-coding content of the sequence of human cytomegalovirus strain AD169. *Curr. Top. Microbiol. Immunol.*, 1990, 154, 125-69.

Chee M.S., Lawrence G.L. Barrell B.G. Alpha-, beta- and gammaherpesviruses encode a putative phosphotransferase. *J Gen Virol*, 1989, 70 (Pt 5), 1151-60.

Chen J.J., Drach J.C. Townsend L.B. Convergent synthesis of polyhalogenated quinoline C-nucleosides as potential antiviral agents. *J Org Chem*, 2003, 68, 4170-8.

Cherrington J.M., Fuller M.D., Lamy P.D., Miner R., Lalezari J.P., Nuesse S., *et al.* In vitro antiviral susceptibilities of isolates from cytomegalovirus retinitis patients receiving first- or second-line cidofovir therapy: relationship to clinical outcome. *J Infect Dis*, 1998, 178, 1821-5.

Chien T.C., S. S. Saluja, J. C. Drach, and L. B. Townsend. Synthesis and evaluation of polyhalogenated imidazole nucleosides: dimensional analogues of 2,5,6-trichloro-1-(Beta-D-ribofuranosyl) benzimidazole. *J. Med. Chem.*, 2004, 47, 5743-52.

Chou S. Cytomegalovirus UL97 mutations in the era of ganciclovir and maribavir. *Rev Med Virol*, 2008, 18, 233-46.

Chou S. Diverse cytomegalovirus UL27 mutations adapt to loss of viral UL97 kinase activity under maribavir. *Antimicrob Agents Chemother*, 2009, 53, 81-5.

Chou S., Guentzel S., Michels K.R., Miner R.C. Drew W.L. Frequency of UL97 phosphotransferase mutations related to ganciclovir resistance in clinical cytomegalovirus isolates. *J. Infect. Dis.*, 1995, 172, 239-42.

Chou S., Lurain N.S., Thompson K.D., Miner R.C. Drew W.L. Viral DNA polymerase mutations associated with drug resistance in human cytomegalovirus. *J Infect Dis*, 2003, 188, 32-9.

Chou S., Marousek G., Guentzel S., Follansbee S.E., Poscher M.E., Lalezari J.P., *et al.* Evolution of mutations conferring multidrug resistance during prophylaxis and therapy for cytomegalovirus disease. *J Infect Dis*, 1997, 176, 786-9.

Chou S., Marousek G., Parenti D.M., Gordon S.M., LaVoy A.G., Ross J.G., *et al.* Mutation in region III of the DNA polymerase gene conferring foscarnet resistance in cytomegalovirus isolates from 3 subjects receiving prolonged antiviral therapy. *J Infect Dis*, 1998, 178, 526-30.

Chou S. Marousek G.I. Accelerated evolution of maribavir resistance in a cytomegalovirus exonuclease domain II mutant. *J Virol*, 2008, 82, 246-53.

Chou S., Marousek G.I., Senters A.E., Davis M.G. Biron K.K. Mutations in the human cytomegalovirus UL27 gene that confer resistance to maribavir. *J Virol*, 2004, 78, 7124-30.

Chou S. Meichsner C.L. A nine-codon deletion mutation in the cytomegalovirus UL97 phosphotransferase gene confers resistance to ganciclovir. *Antimicrob. Agents Chemother*, 2000a, 44, 183-85.

Chou S., Miner R.C. Drew W.L. A deletion mutation in region V of the cytomegalovirus DNA polymerase sequence confers multidrug resistance. *J Infect Dis*, 2000b, 182, 1765-8.

Chou S., Van Wechel L.C., Lichy H.M. Marousek G.I. Phenotyping of cytomegalovirus drug resistance mutations by using recombinant viruses incorporating a reporter gene. *Antimicrob Agents Chemother*, 2005, 49, 2710-5.

Chou S., Van Wechel L.C. Marousek G.I. Effect of cell culture conditions on the anticytomegalovirus activity of maribavir. *Antimicrob Agents Chemother*, 2006, 50, 2557-9.

Chou S., Waldemer R.H., Senters A.E., Michels K.S., Kemble G.W., Miner R.C., *et al.* Cytomegalovirus UL97 phosphotransferase mutations that affect susceptibility to ganciclovir. *J Infect Dis*, 2002, 185, 162-9.

Chou S., Wechel L.C. Marousek G.I. Cytomegalovirus UL97 kinase mutations that confer maribavir resistance. *J Infect Dis*, 2007, 196, 91-4.

Chulay J., Biron K., Wang L., Underwood M., Chamberlain S., Frick L., *et al.* Development of novel benzimidazole riboside compounds for treatment of cytomegalovirus disease. *Adv Exp Med Biol*, 1999, 458, 129-34.

Cihlar T., Fuller M.D. Cherrington J.M. Characterization of drug resistance-associated mutations in the human cytomegalovirus DNA polymerase gene by using recombinant mutant viruses generated from overlapping DNA fragments. *J Virol*, 1998a, 72, 5927-36.

Cihlar T., Fuller M.D., Mulato A.S. Cherrington J.M. A point mutation in the human cytomegalovirus DNA polymerase gene selected in vitro by cidofovir confers a slow replication phenotype in cell culture. *Virology*, 1998b, 248, 382-93.

Compton T. Receptors and immune sensors: the complex entry path of human cytomegalovirus. *Trends Cell Biol*, 2004, 14, 5-8.

Davison A.J. Channel catfish virus: a new type of herpesvirus. *Virology*, 1992, 186, 9-14.

Deback C., Fillet A.M., Dhedin N., Barrou B., Varnous S., Najjioullah F., *et al.* Monitoring of human cytomegalovirus infection in immunosuppressed patients using real-time PCR on whole blood. *J Clin Virol*, 2007, 40, 173-9.

Derbyshire V., Freemont P.S., Sanderson M.R., Beese L., Friedman J.M., Joyce C.M., *et al.* Genetic and crystallographic studies of the 3',5'-exonucleolytic site of DNA polymerase I. *Science*, 1988, 240, 199-201.

Dittmer A. Bogner E. Analysis of the quaternary structure of the putative HCMV portal protein PUL104. *Biochemistry*, 2005, 44, 759-65.

Dittmer A., J. C. Drach, L. B. Townsend, A. Fischer, and E. Bogner. Interaction of the putative human cytomegalovirus portal protein pUL104 with the large terminase subunit pUL56 and its inhibition by benzimidazole-D-ribonucleosides. *Journal of Virology*, 2005, 79, 14660-7.

Dolan A., Cunningham C., Hector R.D., Hassan-Walker A.F., Lee L., Addison C., *et al.* Genetic content of wild-type human cytomegalovirus. *J. Gen. Virol.*, 2004, 85, 1301-12.

Doyle A.M., Warburton K.M., Goral S., Blumberg E., Grossman R.A. Bloom R.D. 24-week oral ganciclovir prophylaxis in kidney recipients is associated with reduced symptomatic cytomegalovirus disease compared to a 12-week course. *Transplantation*, 2006, 81, 1106-11.

Ducancelle A., Champier G., Alain S., Petit F., Le Pors M.J. Mazon M.C. A novel mutation in the UL54 gene of human cytomegalovirus isolates that confers resistance to foscarnet. *Antivir Ther*, 2006a, 11, 537-40.

Ducancelle A. Mazon M.C. L'ADN polymérase du cytomégalo virus humain: structure, inhibiteurs et mécanismes moléculaires de résistance. *Virologie*, 2006b, 10, 83-93.

Eckle T., Prix L., Jahn G., Klingebiel T., Handgretinger R., Selle B., *et al.* Drug-resistant human cytomegalovirus infection in children after allogeneic stem cell transplantation may have different clinical outcomes. *Blood*, 2000, 96, 3286-9.

Eid A.J., Arthurs S.K., Deziel P.J., Wilhelm M.P. Razonable R.R. Emergence of drug-resistant cytomegalovirus in the era of valganciclovir prophylaxis: therapeutic implications and outcomes. *Clin Transplant*, 2008, 22, 162-70.

Eisenberg D., Schwarz E., Komaromy M. Wall R. Analysis of membrane and surface protein sequences with the hydrophobic moment plot. *J Mol Biol*, 1984, 179, 125-42.

Emery V.C. Griffiths P.D. Prediction of cytomegalovirus load and resistance patterns after antiviral chemotherapy. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 2000, 97, 8039.

Erice A. Resistance of cytomegalovirus to antiviral drugs. *Clin. Microbiol. Rev.*, 1999, 12, 286-97.

Erice A., Gil-Roda C., Pérez J.L., Balfour H.H., Sannerud J.K., Hanson M.H., *et al.* Antiviral susceptibilities and analysis of UL97 and DNA polymerase sequences of clinical cytomegalovirus isolates from immunocompromised patients. *J. Infect. Dis.*, 1997, 175, 1087-92.

Evers D.L., Komazin G., Ptak R.G., Shin D., Emmer B.T., Townsend L.B., *et al.* Inhibition of human cytomegalovirus replication by benzimidazole nucleosides involves three distinct mechanisms. *Antimicrob Agents Chemother*, 2004, 48, 3918-27.

Fishman J.A. Infection in solid-organ transplant recipients. *N Engl J Med*, 2007, 357, 2601-14.

Fishman J.A. Rubin R.H. Infection in organ-transplant recipients. *N Engl J Med*, 1998, 338, 1741-51.

Fowler K.B., Dahle A.J., Boppana S.B. Pass R.F. Newborn hearing screening: will children with hearing loss caused by congenital cytomegalovirus infection be missed? *J Pediatr*, 1999, 135, 60-4.

Fowler K.B., Stagno S., Pass R.F., Britt W.J., Boll T.J., Alford C.A. The outcome of congenital cytomegalovirus infection in relation to maternal antibody status. *N Engl J Med*, 1992, 326, 663-7.

Freemont P.S., Friedman J.M., Beese L.S., Sanderson M.R., Steitz T.A. Cocrystal structure of an editing complex of Klenow fragment with DNA. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1988, 85, 8924-8.

Frey S.E., Harrison C., Pass R.F., Yang E., Boken D., Sekulovich R.E., *et al.* Effects of antigen dose and immunization regimens on antibody responses to a cytomegalovirus glycoprotein B subunit vaccine. *J Infect Dis*, 1999, 180, 1700-3.

Gallant J.E., Moore R.D., Richman D.D., Keruly J., Chaisson R.E. Incidence and natural history of cytomegalovirus disease in patients with advanced human immunodeficiency virus disease treated with zidovudine. The Zidovudine Epidemiology Study Group. *J Infect Dis*, 1992, 166, 1223-7.

Galli L., Novelli A., Chiappini E., Gervaso P., Cassetta M.I., Fallani S., *et al.* Valganciclovir for congenital CMV infection: a pilot study on plasma concentration in newborns and infants. *Pediatr Infect Dis J*, 2007, 26, 451-3.

Gandhi M.K., Khanna R. Human cytomegalovirus: clinical aspects, immune regulation, and emerging treatments. *The Lancet infectious diseases*, 2004, 4, 725-38.

Gao L., Qian S., Zeng L., Wang R., Wei G., Fan J., *et al.* An animal model of human cytomegalovirus infection. *Transplant Proc*, 2007, 39, 3438-43.

Garrigue I., Doussau A., Asselineau J., Bricout H., Couzi L., Rio C., *et al.* Prediction of cytomegalovirus (CMV) plasma load from evaluation of CMV whole-blood load in samples from renal transplant recipients. *J Clin Microbiol*, 2008, 46, 493-8.

Gault E., Michel Y., Dehee A., Belabani C., Nicolas J.C., Garbarg-Chenon A. Quantification of human cytomegalovirus DNA by real-time PCR. *J Clin Microbiol*, 2001, 39, 772-5.

Gaytant M.A., Rours G.I., Steegers E.A., Galama J.M., Semmekrot B.A. Congenital cytomegalovirus infection after recurrent infection: case reports and review of the literature. *Eur J Pediatr*, 2003, 162, 248-53.

Gerna G., Baldanti F., Revello M.G. Pathogenesis of human cytomegalovirus infection and cellular targets. *Human Immunol.*, 2004, 65, 381-86.

Gerna G., Zavattoni M., Baldanti F., Furione M., Chezzi L., Revello M.G., *et al.* Circulating cytomegalic endothelial cells are associated with high human cytomegalovirus

(HCMV) load in AIDS patients with late-stage disseminated HCMV disease. *J. Med. Virol.*, 1998, 55, 64-74.

Gershburg E., Hong K. Pagano J.S. Effects of maribavir and selected indolocarbazoles on Epstein-Barr virus protein kinase BGLF4 and on viral lytic replication. *Antimicrob Agents Chemother*, 2004, 48, 1900-3.

Giesen K., Radsak K. Bogner E. Targeting the gene product encoded by ORF UL56 of human cytomegalovirus into viral replication centers. *FEBS Lett.*, 2000a, 471, 215-18.

Giesen K., Radsak K. Bogner E. The potential terminase subunit pUL56 of HCMV is translocated into the nucleus by its own NLS and interacts with importin-alpha. *J. Gen. Virol.*, 2000b, 81, 2231-44.

Gilbert C. Boivin G. Human cytomegalovirus resistance to antiviral drugs. *Antimicrob Agents Chemother*, 2005, 49, 873-83.

Gill R.B., Frederick S.L., Hartline C.B., Chou S. Prichard M.N. Conserved retinoblastoma protein-binding motif in human cytomegalovirus UL97 kinase minimally impacts viral replication but affects susceptibility to maribavir. *Virol J*, 2009, 6, 9.

Gohring K., Mikeler E., Jahn G., Rohde F. Hamprecht K. Rapid semiquantitative real-time PCR for the detection of human cytomegalovirus UL97 mutations conferring ganciclovir resistance. *Antivir Ther*, 2008, 13, 461-6.

Goodpasture E.W. Talbot F.B. Nature of protozoan like cells in certain lesions of infancy. *American Journal of Diseases of Children*, 1921, 21, 415.

Gouarin S., Vabret A., Scieux C., Agbalika F., Cherot J., Mengelle C., *et al.* Multicentric evaluation of a new commercial cytomegalovirus real-time PCR quantitation assay. *J Virol Methods*, 2007, 146, 147-54.

Hamprecht K., Maschmann J., Jahn G., Poets C.F. Goelz R. Cytomegalovirus transmission to preterm infants during lactation. *J Clin Virol*, 2008, 41, 198-205.

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

Hanson M.N., Preheim L.C., Chou S., Talarico C.L., Biron K.K. Erice A. Novel mutation in the UL97 gene of a clinical cytomegalovirus strain conferring resistance to ganciclovir. *Antimicrob Agents Chemother*, 1995, 39, 1204-5.

Hantz S., M.C. M., Alain S. Leruez-Ville M. Traitement des infections à CMV. *Médecine thérapeutique*, 2009, (in press),

Hantz S., Michel D., Fillet A.M., Guignon V., Champier G., Mazon M.C., *et al.* 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. *Antimicrob Agents Chemother*, 2005, 49, 1580-3.

He Z., He Y.S., Kim Y., Chu L., Ohmstede C., Biron K.K., *et al.* The human cytomegalovirus UL97 protein is a protein kinase that autophosphorylates on serines and threonines. *J Virol*, 1997, 71, 405-11.

Heineman T.C., Schleiss M., Bernstein D.I., Spaete R.R., Yan L., Duke G., *et al.* A phase 1 study of 4 live, recombinant human cytomegalovirus Towne/Toledo chimeric vaccines. *J Infect Dis*, 2006, 193, 1350-60.

Hodson E.M., Barclay P.G., Craig J.C., Jones C., Kable K., Strippoli G.F., *et al.* Antiviral medications for preventing cytomegalovirus disease in solid organ transplant recipients. *Cochrane Database Syst Rev*, 2005, CD003774.

Holzenburg A., Dittmer A., Bogner E. Assembly of monomeric HCMV pUL104 into portal structures. *J Gen Virol*, 2009, 90(Pt10), 2381-5.

Humar A., Kumar D., Preiksaitis J., Boivin G., Siegal D., Fenton J., *et al.* A trial of valganciclovir prophylaxis for cytomegalovirus prevention in lung transplant recipients. *Am J Transplant*, 2005, 5, 1462-8.

Hwang J.S., Bogner E. ATPase activity of the terminase subunit pUL56 of Human Cytomegalovirus. *The Journal of Biological Chemistry*, 2002, 277, 6943-8.

Imbert-Marcille B.M. Histoire naturelle des infections à cytomégalo virus. *Médecine thérapeutique*, 2001, 7, 577-84.

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

Jacquemard F., Yamamoto M., Costa J.M., Romand S., Jaqz-Aigrain E., Dejean A., *et al.* Maternal administration of valaciclovir in symptomatic intrauterine cytomegalovirus infection. *BJOG*, 2007, 114, 1113-21.

Jault F.M., Jault J.M., Ruchti F., Fortunato E.A., Clark C., Corbeil J., *et al.* Cytomegalovirus infection induces high levels of cyclins, phosphorylated Rb, and p53, leading to cell cycle arrest. *J Virol*, 1995, 69, 6697-704.

Kalejta R.F. Tegument proteins of human cytomegalovirus. *Microbiol Mol Biol Rev*, 2008, 72, 249-65.

Kamar N., Mengelle C., Esposito L., Guitard J., Mehrenberger M., Lavayssiere L., *et al.* Predictive factors for cytomegalovirus reactivation in cytomegalovirus-seropositive kidney-transplant patients. *J Med Virol*, 2008, 80, 1012-7.

Kamil J.P. Coen D.M. Human cytomegalovirus protein kinase UL97 forms a complex with the tegument phosphoprotein pp65. *J Virol*, 2007, 81, 10659-68.

Kamps M.P. Sefton B.M. Neither arginine nor histidine can carry out the function of lysine-295 in the ATP-binding site of p60src. *Mol Cell Biol*, 1986, 6, 751-7.

Kaptein S.J., Efferth T., Leis M., Rechter S., Auerochs S., Kalmer M., *et al.* The anti-malaria drug artesunate inhibits replication of cytomegalovirus in vitro and in vivo. *Antiviral Res*, 2006, 69, 60-9.

Kawaguchi Y., Matsumura T., Roizman B. Hirai K. Cellular elongation factor 1delta is modified in cells infected with representative alpha-, beta-, or gammaherpesviruses. *J Virol*, 1999, 73, 4456-60.

Kelman Z., Hurwitz J. O'Donnell M. Processivity of DNA polymerases: two mechanisms, one goal. *Structure*, 1998, 6, 121-5.

Kemper B. Garabett M. Studies on T4-head maturation. 1. Purification and characterization of gene-49-controlled endonuclease. *Eur. J. Biochem.*, 1981, 115, 123-31.

Kemper B. Janz E. Function of gene 49 of bacteriophage T4. I. Isolation and biochemical characterization of very fast-sedimenting DNA. *J. Virol.*, 1976, 18, 992-9.

Kenneson A. Cannon M.J. Review and meta-analysis of the epidemiology of congenital cytomegalovirus (CMV) infection. *Rev Med Virol*, 2007, 17, 253-76.

Kern E.R., Kushner N.L., Hartline C.B., Williams-Aziz S.L., Harden E.A., Zhou S., *et al.* In vitro activity and mechanism of action of methylenecyclopropane analogs of nucleosides against herpesvirus replication. *Antimicrob Agents Chemother*, 2005, 49, 1039-45.

Khan R.F., Mori S., Eizuru S., Ishii K.K. Minamishima Y. Genetic analysis of a ganciclovir-resistant human cytomegalovirus mutant. *Antiviral Research*, 1998, 40, 95-103.

Kimberlin D.F., Weller S., Whitley R.J., Andrews W.W., Hauth J.C., Lakeman F., *et al.* Pharmacokinetics of oral valacyclovir and acyclovir in late pregnancy. *Am J Obstet Gynecol*, 1998, 179, 846-51.

Kimberlin D.W., Acosta E.P., Sanchez P.J., Sood S., Agrawal V., Homans J., *et al.* Pharmacokinetic and pharmacodynamic assessment of oral valganciclovir in the treatment of symptomatic congenital cytomegalovirus disease. *J Infect Dis*, 2008, 197, 836-45.

Kimberlin D.W., Lin C.Y., Sanchez P.J., Demmler G.J., Dankner W., Shelton M., *et al.* Effect of ganciclovir therapy on hearing in symptomatic congenital cytomegalovirus disease involving the central nervous system: a randomized, controlled trial. *J Pediatr*, 2003, 143, 16-25.

Komazin G., Ptak R.G., Emmer B.T., Townsend L.B. Drach J.C. Resistance of human cytomegalovirus to the benzimidazole L-ribonucleoside maribavir maps to UL27. *J Virol*, 2003, 77, 11499-506.

Komazin G., Townsend L.B. Drach J.C. Role of a mutation in human cytomegalovirus gene UL104 in resistance to benzimidazole ribonucleosides. *J Virol*, 2004, 78, 710-5.

Kondo K., Kaneshima H. Mocarski E.S. Human cytomegalovirus latent infection of granulocyte-macrophage progenitors *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1994, 91, 18879-83.

Konoplev S., Champlin R.E., Giralt S., Ueno N.T., Khouri I., Raad I., *et al.* Cytomegalovirus pneumonia in adult autologous blood and marrow transplant recipients. *Bone Marrow Transplant*, 2001, 27, 877-81.

Koszalka G.W., Johson N.W., Good S.S., Boyd L.F., Chamberlain S.C., Townsend L.B., *et al.* Preclinical and toxicology studies of 1263W94, a potent and selective inhibitor of human cytomegalovirus replication. *Antimicrob. Agents Chemother*, 2002, 46, 2373-80.

Kouzarides T., Bankier A.T., Satchwell S.C., Weston P., Tomlinson P. Barell B. Sequence and transcription analysis of the human cytomegalovirus DNA polymerase gene. *J. Virol.*, 1986, 61, 125-33.

Krosky P.M., Baek M.C. Coen D.M. The human cytomegalovirus UL97 protein kinase, an antiviral drug target, is required at the stage of nuclear egress. *J Virol*, 2003a, 77, 905-14.

Krosky P.M., Baek M.C., Jahng W.J., Barrera I., Harvey R.J., Biron K.K., *et al.* The human cytomegalovirus UL44 protein is a substrate for the UL97 protein kinase. *J Virol*, 2003b, 77, 7720-7.

Krosky P.M., Underwood M.L., Turk S.R., Feng K.W.H., Jain R.K., Ptak R.G., *et al.* Resistance of human cytomegalovirus to benzimidazole ribonucleosides maps to two open reading frames: UL89 and UL56. *J. Virol*, 1998, 72, 4721-28.

Lalezari J.P., Aberg J.A., Wang L.H., Wire M.B., Miner R., Snowden W., *et al.* 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*, 2002, 46, 2969-76.

Larder B.A., Kemp S.D., Darby G. Related functional domains in virus DNA polymerases. *EMBO J*, 1987, 6, 169-75.

Lee C.H., Bright D.C., Ferrucci S. Treatment of cytomegalovirus retinitis with oral valganciclovir in an acquired immunodeficiency syndrome patient unresponsive to combination antiretroviral therapy. *Optometry*, 2006, 77, 167-76.

Len O., Gavalda J., Aguado J.M., Borrell N., Cervera C., Cisneros J.M., *et al.* Valganciclovir as treatment for cytomegalovirus disease in solid organ transplant recipients. *Clin Infect Dis*, 2008, 46, 20-7.

Leruez-Ville M., Ouachee M., Delarue R., Sauget A.S., Blanche S., Buzyn A., *et al.* Monitoring cytomegalovirus infection in adult and pediatric bone marrow transplant recipients by a real-time PCR assay performed with blood plasma. *J Clin Microbiol*, 2003, 41, 2040-6.

Li F., Kenyon K.W., Kirby K.A., Fishbein D.P., Boeckh M., Limaye A.P. Incidence and clinical features of ganciclovir-resistant cytomegalovirus disease in heart transplant recipients. *Clin Infect Dis*, 2007, 45, 439-47.

Limaye A.P. Ganciclovir-resistant cytomegalovirus in organ transplant recipients. *Clin Infect Dis*, 2002, 35, 866-72.

Limaye A.P., Corey L., Koelle D.M., Davis C.L., Boeckh M. Emergence of ganciclovir-resistant cytomegalovirus disease among recipients of solid-organ transplants. *Lancet*, 2000, 356, 645-9.

Lin A., Xu H., Yan W. Modulation of HLA expression in human cytomegalovirus immune evasion. *Cell Mol Immunol*, 2007, 4, 91-8.

Littler E., Stuart A.D., Chee M.S. Human cytomegalovirus UL97 open reading frame encodes a protein that phosphorylates the antiviral nucleoside analogue ganciclovir. *Nature*, 1992, 358, 160-2.

Ljungman P., de La Camara R., Milpied N., Volin L., Russell C.A., Crisp A., *et al.* Randomized study of valganciclovir as prophylaxis against cytomegalovirus reactivation in recipients of allogeneic bone marrow transplants. *Blood*, 2002, 99, 3050-6.

Long M.C., Leong V., Schaffer P.A., Spencer C.A., Rice S.A. ICP22 and the UL13 protein kinase are both required for herpes simplex virus-induced modification of the large subunit of RNA polymerase II. *J Virol*, 1999, 73, 5593-604.

Lowance D., Neumayer H.H., Legendre C.M., Squifflet J.P., Kovarik J., Brennan P.J., *et al.* Valganciclovir for the prevention of cytomegalovirus disease after renal transplantation.

International Valacyclovir Cytomegalovirus Prophylaxis Transplantation Study Group. *N Engl J Med*, 1999, 340, 1462-70.

Lurain N.S., Bhorade S.M., Pursell K.J., Avery R.K., Yeldandi V.V., Isada C.M., *et al.* Analysis and characterization of antiviral drug-resistant cytomegalovirus isolates from solid organ transplant recipients. *J. Infect. Dis.*, 2002, 186, 760-8.

Lurain N.S., Spafford L.E. Thompson K.D. Mutation in the UL97 open reading frame of human cytomegalovirus strains resistant to ganciclovir. *I. Virol.*, 1994, 68, 4427-31.

Lurain N.S., Thompson K.D., Holmes E.W. Read G.S. Point mutations in the DNA polymerase gene of human cytomegalovirus that result in resistance to antiviral agents. *J Virol*, 1992, 66, 7146-52.

Marfori J.E., Exner M.M., Marousek G.I., Chou S. Drew W.L. Development of new cytomegalovirus UL97 and DNA polymerase mutations conferring drug resistance after valganciclovir therapy in allogeneic stem cell recipients. *J Clin Virol*, 2007, 38, 120-5.

Marschall M., Freitag M., Suchy P., Romaker D., Kupfer R., Hanke M., *et al.* The protein kinase pUL97 of human cytomegalovirus interacts with and phosphorylates the DNA polymerase processivity factor pUL44. *Virology*, 2003, 311, 60-71.

Marschall M., Marzi A., aus dem Siepen P., Jochmann R., Kalmer M., Auerochs S., *et al.* Cellular p32 recruits cytomegalovirus kinase pUL97 to redistribute the nuclear lamina. *J Biol Chem*, 2005, 280, 33357-67.

Marshall G.S., Rabalais G.P., Stewart J.A. Dobbins J.G. Cytomegalovirus seroprevalence in women bearing children in Jefferson county. *Am. J. Med. Sci.*, 1993, 305, 292-6.

Martin B.K., Ricks M.O., Forman M.S. Jabs D.A. Change over time in incidence of ganciclovir resistance in patients with cytomegalovirus retinitis. *Clin Infect Dis*, 2007, 44, 1001-8.

Mazeron M.C., Alain S., Leruez-Ville M. Schnepf N. Infections à cytomégalovirus. In: EMC. Paris: Elsevier Masson SAS, 2009, 8-052-C-10.

Mazeron M.C., Benjelloun B., Bertrand C., Pons J.L. Perol Y. Comparison of MRC-5 and continuous cell lines for detection of cytomegalovirus in centrifugation cultures. *J Virol Methods*, 1992, 39, 311-7.

McVoy M.A. Adler S.P. Human cytomegalovirus DNA replicates after early circularization by concatemer formation, and inversion occurs within the concatemer. *J Virol*, 1994, 68, 1040-51.

McVoy M.A. Nixon D.E. Impact of 2-bromo-5,6-dichloro-1-beta-D-ribofuranosyl benzimidazole riboside and inhibitors of DNA, RNA, and protein synthesis on human cytomegalovirus genome maturation. *J Virol*, 2005, 79, 11115-27.

McVoy M.A. Ramnarain D. Machinery to support genome segment inversion exists in a herpesvirus which does not naturally contain invertible elements. *J Virol*, 2000, 74, 4882-7.

Meine Jansen C.F., Toet M.C., Rademaker C.M., Ververs T.F., Gerards L.J. van Loon A.M. Treatment of symptomatic congenital cytomegalovirus infection with valganciclovir. *J Perinat Med*, 2005, 33, 364-6.

Mendes A.V., Benard G., Pereira C.B., Kallas E.G., Duarte A.J., Pannuti C.S., *et al.* Different kinetics in anti-cytomegalovirus immunity reconstitution evaluated by lymphocyte proliferation and IFN-gamma production in allogeneic and autologous bone marrow transplantation. *Acta Haematol*, 2002, 107, 187-94.

Mengelle C., Sandres-Saune K., Pasquier C., Rostaing L., Mansuy J.M., Marty M., *et al.* Automated extraction and quantification of human cytomegalovirus DNA in whole blood by real-time PCR assay. *J Clin Microbiol*, 2003, 41, 3840-5.

Metzger C., Michel D., Schneider K., Luske A., Schlicht H.J. Mertens T. Human cytomegalovirus UL97 kinase confers ganciclovir susceptibility to recombinant vaccinia virus. *J Virol*, 1994, 68, 8423-7.

Michel D., Kramer S., Höln S., Schaarschmidt P., Wunderlich K. Mertens T. Amino acids of conserved kinase motifs of cytomegalovirus protein UL97 are essential for autophosphorylation. *J. Virol*, 1999, 73, 8898-901.

Michel D. Mertens T. The UL97 protein kinase of human cytomegalovirus and homologues in other herpesviruses: impact on virus and host. *Biochim Biophys Acta*, 2004, 1697, 169-80.

Michel D., Pavic I., Zimmermann A., Haupt E., Wunderlich K., Heuschmid M., *et al.* The UL97 gene product of human cytomegalovirus is an early-late protein with a nuclear localization but is not a nucleoside kinase. *J Virol*, 1996, 70, 6340-6.

Michel D., Schaarschmidt P., Wunderlich K., Heuschmid M., Simoncini L., Mühlberger D., *et al.* Functional regions of the human cytomegalovirus protein pUL97 involved in nuclear localization and phosphorylation of ganciclovir and pUL97 itself. *J. Gen. Virol.*, 1998, 79, 2105-12.

Michelin B.D., Hadzisejdic I., Bozic M., Grahovac M., Hess M., Grahovac B., *et al.* Detection of cytomegalovirus (CMV) DNA in EDTA whole-blood samples: evaluation of the

quantitative artus CMV LightCycler PCR kit in conjunction with automated sample preparation. *J Clin Microbiol*, 2008, 46, 1241-5.

Mitchell D.K., Holmes S.J., Burke R.L., Duliege A.M. Adler S.P. Immunogenicity of a recombinant human cytomegalovirus gB vaccine in seronegative toddlers. *Pediatr Infect Dis J*, 2002, 21, 133-8.

Mitchell M.S., S. Matsuzaki, S. Imai, and V. B. Rao. 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.*, 2002, 30, 4009-21.

Mocarski E.S., Shenk T. Pass R.F. Cytomegaloviruses. In: Knipe D. M. and Howley P. M. (éd), *Fields Virology*. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins, 2007, 2701-72.

Mousavi-Jazi M., Schloss L., Drew W.L., Linde A., Miner R.C., Harmenberg J., *et al.* Variations in the cytomegalovirus DNA polymerase and phosphotransferase genes in relation to foscarnet and ganciclovir sensitivity. *J Clin Virol*, 2001, 23, 1-15.

Mousavi-Jazi M., Schloss L., Wahren B. Brytting M. Point mutations induced by foscarnet (PFA) in the human cytomegalovirus DNA polymerase. *J Clin Virol*, 2003, 26, 301-6.

Muller A., Eis-Hubinger A.M., Brandhorst G., Heep A., Bartmann P. Franz A.R. Oral valganciclovir for symptomatic congenital cytomegalovirus infection in an extremely low birth weight infant. *J Perinatol*, 2008, 28, 74-6.

Najioullah F., Thouvenot D. Lina B. Development of a real-time PCR procedure including an internal control for the measurement of HCMV viral load. *J Virol Methods*, 2001, 92, 55-64.

Newcomb W.W., Homa F.L. Brown J.C. Involvement of the portal at an early step in herpes simplex virus capsid assembly. *J Virol*, 2005, 79, 10540-6.

Newcomb W.W., Juhas R.M., R. T.D., Homa F.L., Burch A.D., Weller S.K., *et al.* The UL6 gene product forms the portal for the entry of DNA into the herpes simplex virus capsid. *J. Virol.*, 2001, 75, 10923-32.

Ng T.I., Talarico C., Burnette T.C., Biron K. Roizman B. Partial substitution of the functions of the herpes simplex virus 1 U(L)13 gene by the human cytomegalovirus U(L)97 gene. *Virology*, 1996, 225, 347-58.

Nigro G., Adler S.P., La Torre R. Best A.M. Passive immunization during pregnancy for congenital cytomegalovirus infection. *N Engl J Med*, 2005, 353, 1350-62.

Nixon D.E. McVoy M.A. 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*, 2004, 78, 1623-1635.

Nordoy I., Muller F. Nordal K.P. The role of the tumor necrosis factor and interleukin-10 during cytomegalovirus infection in renal transplant recipient. *J. Infect. Dis.*, 2000, 181, 51-7.

Pass R.F. Congenital cytomegalovirus infection and hearing loss. *Herpes*, 2005, 12, 50-5.

Pass R.F., Zhang C., Evans A., Simpson T., Andrews W., Huang M.L., *et al.* Vaccine prevention of maternal cytomegalovirus infection. *N Engl J Med*, 2009, 360, 1191-9.

Paya C., Humar A., Dominguez E., Washburn K., Blumberg E., Alexander B., *et al.* Efficacy and safety of valganciclovir vs. oral ganciclovir for prevention of cytomegalovirus disease in solid organ transplant recipients. *Am J Transplant*, 2004, 4, 611-20.

Pellegrin I., Garrigue I., Ekouevi D., Couzi L., Merville P., Merel P., *et al.* New molecular assays to predict occurrence of cytomegalovirus disease in renal transplant recipients. *J Infect Dis*, 2000, 182, 36-42.

Pereyra F. Rubin R.H. Prevention and treatment of cytomegalovirus infection in solid organ transplant recipients. *Curr Opin Infect Dis*, 2004, 17, 357-61.

Piiparinen H., Hockerstedt K., Gronhagen-Riska C. Lautenschlager I. Comparison of two quantitative CMV PCR tests, Cobas Amplicor CMV Monitor and TaqMan assay, and pp65-antigenemia assay in the determination of viral loads from peripheral blood of organ transplant patients. *J Clin Virol*, 2004, 30, 258-66.

Pouteil-Noble C., Ecochard R., Landrivon G., Donia-Maged A., Tardy J.C., Bosshard S., *et al.* Cytomegalovirus infection--an etiological factor for rejection? A prospective study in 242 renal transplant patients. *Transplantation*, 1993, 55, 851-7.

Prichard M.N. Function of human cytomegalovirus UL97 kinase in viral infection and its inhibition by maribavir. *Rev Med Virol*, 2009, 19, 215-29.

Prichard M.N., Britt W.J., Daily S.L., Hartline C.B. Kern E.R. Human cytomegalovirus UL97 Kinase is required for the normal intranuclear distribution of pp65 and virion morphogenesis. *J Virol*, 2005, 79, 15494-502.

Prichard M.N., Gao N., Jairath S., Mulamba G., Krosky P., Coen D.M., *et al.* A recombinant human cytomegalovirus with a large deletion in UL97 has a severe replication deficiency. *J Virol*, 1999, 73, 5663-70.

Prichard M.N., Quenelle D.C., Bidanset D., Komazin G., Chou S., Drach J.C., *et al.* Human cytomegalovirus UL27 is not required for viral replication in human tissue implanted in SCID mice. *Viol J*, 2006, 3, 18.

Prichard M.N., Sztul E., Daily S.L., Perry A.L., Frederick S.L., Gill R.B., *et al.* Human cytomegalovirus UL97 kinase activity is required for the hyperphosphorylation of retinoblastoma protein and inhibits the formation of nuclear aggresomes. *J Virol*, 2008, 82, 5054-67.

Razonable R.R. Epidemiology of cytomegalovirus disease in solid organ and hematopoietic stem cell transplant recipients. *Am J Health Syst Pharm*, 2005, 62, S7-13.

Reddehase M.J. The immunogenicity of human and murine cytomegaloviruses. *Curr Opin Immunol.*, 2000, 12, 390-6.

Reeves M.B., MacAry P.A., Lehner P.J., Sissons J.G. Sinclair J.H. Latency, chromatin remodeling, and reactivation of human cytomegalovirus in the dendritic cells of healthy carriers. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2005, 102, 4140-5.

Remenyi A., Good M.C. Lim W.A. Docking interactions in protein kinase and phosphatase networks. *Curr Opin Struct Biol*, 2006, 16, 676-85.

Roizman B., Carmichael L.E., Deinhardt F., de-The G., Nahmias A.J., Plowright W., *et al.* Herpesviridae. Definition, provisional nomenclature, and taxonomy. The Herpesvirus Study Group, the International Committee on Taxonomy of Viruses. *Intervirology*, 1981, 16, 201-17.

Romaker D., Schregel V., Maurer K., Auerochs S., Marzi A., Sticht H., *et al.* Analysis of the structure-activity relationship of four herpesviral UL97 subfamily protein kinases reveals partial but not full functional conservation. *J Med Chem*, 2006, 49, 7044-53.

Rowe W.P., Hartley J.W., Waterman S., Turner H.C. Huebner R.J. Cytopathogenic agent resembling human salivary gland virus recovered from tissue cultures of human adenoids. *Proc Soc Exp Biol Med*, 1956, 92, 418-24.

Rowshani A.T., Bemelman F.J., van Leeuwen E.M.M., van Lier R.A.W. ten Berge I.J.M. Clinical and immunologic aspects of cytomegalovirus infection in solid organ transplant recipients. *Transplantation*, 2005, 79, 381-6.

Rubin R.H. Prevention of cytomegalovirus infection in organ transplant recipients. *Transpl Infect Dis*, 2000, 2, 99-100.

Salmon-Ceron D. Manifestations cliniques de l'infection à cytomégalo­virus au cours du SIDA. In: Nicolas J. C. (éd), Cytomégalo­virus. Paris: Elsevier Collection MediBio, 2002, 121-9.

Savva C.G.W., Holzenburg A. Bogner E. Insights into the structure of human cytomegalovirus large terminase subunit pUL56. *FEBS Letters*, 2004, 563, 135-40.

Scheffezik H., Savva C. G. W., Holzenburg A., Kolessnikova L. Bogner E. The terminase subunits pUL56 and pUL89 of Human Cytomegalovirus are DNA-metabolising proteins with toroïdal structure. *Nucleic Acids Res.*, 2002, 30, 1695-703.

Schleiss M. Progress in cytomegalovirus vaccine development. *Herpes*, 2005, 12, 66-75.

Schnepf N., Boiteau N., Petit F., Alain S., Sanson-Le Pors M.J. Mazon M.C. Rapid determination of antiviral drug susceptibility of human cytomegalovirus by real-time PCR. *Antiviral Res*, 2009, 81, 64-7.

Scholz B., Rechter S., Drach J.C., Townsend L.B. Bogner E. Identification of the ATP-binding site in the terminase subunit pUL56 of human cytomegalovirus. *Nucleic Acids Res*, 2003, 31, 1426-33.

Scott G.M., Weinberg A., Rawlinson W.D., Chou S. Multidrug resistance conferred by novel DNA polymerase mutations in human cytomegalovirus isolates. *Antimicrob Agents Chemother*, 2007, 51, 89-94.

Shapira M.Y., Resnick I.B., Chou S., Neumann A.U., Lurain N.S., Stamminger T., *et al.* Artesunate as a potent antiviral agent in a patient with late drug-resistant cytomegalovirus infection after hematopoietic stem cell transplantation. *Clin Infect Dis*, 2008, 46, 1455-7.

Sinclair J. Sissons P. Latency and reactivation of human cytomegalovirus. *J Gen Virol*, 2006, 87, 1763-79.

Smith I.L., Cherrington J.M., Jiles R.E., Fuller M.D., Freeman W.R. Spector S.A. High-level resistance of cytomegalovirus to ganciclovir is associated with alterations in both the UL97 and DNA polymerase genes. *J Infect Dis*, 1997, 176, 69-77.

Smith I.L., Taskintuna I., Rahhal F.M., Powell H.C., Ai E., Mueller A.J., *et al.* Clinical failure of CMV retinitis with intravitreal cidofovir is associated with antiviral resistance. *Arch Ophthalmol*, 1998, 116, 178-85.

Smith M.G. Propagation in tissue cultures of a cytopathogenic virus from human salivary gland virus (SGV) disease. *Proc Soc Exp Biol Med*, 1956, 92, 424-30.

Smith R.F. Smith T.F. Identification of new protein kinase-related genes in three herpesviruses, herpes simplex virus, varicella-zoster virus, and Epstein-Barr virus. *J Virol*, 1989, 63, 450-5.

Sodeberg-Naucler C., Fish K.N. Nelson J.A. Reactivation of latent cytomegalovirus by allogenic stimulation of blood cells from healthy donors. *Cell*, 1997, 91, 119-26.

Soderberg-Naucler C. Does cytomegalovirus play a causative role in the development of various inflammatory diseases and cancer? *J Intern Med*, 2006, 259, 219-46.

Soderberg-Naucler C. Nelson J.Y. Human cytomegalovirus latency and reactivation - a delicate balance between the virus and its host's immune system. *Intervirol*, 1999, 42, 314-21.

Speich R. Van Der B.W. Epidemiology and management of infections after lung transplantation. *Clin. Infect. Dis.*, 2001, 33, S58-S65.

Springer K.L., Chou S., Li S., Giller R.H., Quinones R., Shira J.E., *et al.* How evolution of mutations conferring drug resistance affects viral dynamics and clinical outcomes of cytomegalovirus-infected hematopoietic cell transplant recipients. *J Clin Microbiol*, 2005, 43, 208-13.

Sullivan V., Talarico C.L., Stanat S.C., Davis M.G., Coen D.M. Biron K.K. A protein kinase homologue controls phosphorylation of ganciclovir in human cytomegalovirus-infected cells. *Nature*, 1992, 358, 162-64.

Tang W., Elmore S.H., Fan H., Thorne L.B. Gulley M.L. Cytomegalovirus DNA measurement in blood and plasma using Roche LightCycler CMV quantification reagents. *Diagn Mol Pathol*, 2008, 17, 166-73.

Thoma C., Borst E., Messerle M., Rieger M., Hwang J.S. Bogner E. Identification of the interaction domain of the small terminase subunit pUL89 with the large subunit pUL56 of human cytomegalovirus. *Biochemistry*, 2006, 45, 8855-63.

Townsend L.B., Devivar R., Turk S.R., Nassiri M.R. Drach J.C. Design, synthesis, and antiviral activity of certain 2,5,6-trihalo-1-(beta-D-ribofuranosyl)benzimidazoles. *J. Med. Chem*, 1995, 38, 4098-105.

Underwood M.L., Harvey R.J., Stanat S.C., Hemphill M.L., Miller T., Drach J.C., *et al.* Inhibition of Human Cytomegalovirus DNA maturation by a benzimidazole ribonucleoside is mediated through the UL89 gene product. *J. Virol*, 1998, 72, 717-25.

von Muller L., Hinz J., Bommer M., Hampl W., Kluwick S., Wiedmann M., *et al.* CMV monitoring using blood cells and plasma: a comparison of apples with oranges? *Bone Marrow Transplant*, 2007, 39, 353-7.

Wagner M., Michel D., Schaarschmidt P., Vaida B., Jonjic S., Messerle M., *et al.* Comparison between human cytomegalovirus pUL97 and murine cytomegalovirus (MCMV) pM97 expressed by MCMV and vaccinia virus: pM97 does not confer ganciclovir sensitivity. *J Virol*, 2000, 74, 10729-36.

Walker J., M. Saraste, M. Runswick, and N. Gay. 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.*, 1982, 1, 945-51.

Walker R.C., Marshall W.F. Strickler J.G. Pretransplantation assessment of the risk of lymphoproliferative disorder. *Clin. Infect. Dis.*, 1995, 20, 1346-53.

Walter E.A., Greenberg P.D., Gilbert M.J., Finch R.J., Watanabe K.S., Thomas E.D., *et al.* Reconstitution of cellular immunity against cytomegalovirus in recipients of allogeneic bone marrow by transfer of T-cell clones from the donor. *N Engl J Med*, 1995, 333, 1038-44.

Wang X., Huong S.M., Chiu M.L., Raab-Traub N. Huang E.S. Epidermal growth factor receptor is a cellular receptor for human cytomegalovirus. *Nature*, 2003, 424, 456-61.

Weclawiak H., Kamar N., Mengelle C., Guitard J., Esposito L., Lavayssiere L., *et al.* Cytomegalovirus prophylaxis with valganciclovir in cytomegalovirus-seropositive kidney-transplant patients. *J Med Virol*, 2008, 80, 1228-32.

Weinberg A., Jabs D.A., Chou S., Martin B.K., Lurain N.S., Forman M.S., *et al.* Mutations conferring foscarnet resistance in a cohort of patients with acquired immunodeficiency syndrome and cytomegalovirus retinitis. *J Infect Dis*, 2003, 187, 777-84.

Weller T.H., Hanshaw J.B. Scott D.E. Serologic differentiation of viruses responsible for cytomegalic inclusion disease. *Virology*, 1960, 12, 130-2.

Whitley R.J., Jacobson M.A., Friedberg D.N., Holland G.N., Jabs D.A., Dieterich D.T., *et al.* Guidelines for the treatment of cytomegalovirus diseases in patients with AIDS in the era of potent antiretroviral therapy: recommendations of an international panel. International AIDS Society-USA. *Arch Intern Med*, 1998, 158, 957-69.

Williams S.L., Hartline C.B., Kushner N.L., Harden E.A., Bidanset D.J., Drach J.C., *et al.* In vitro activities of benzimidazole D- and L-ribonucleosides against herpesviruses. *Antimicrob Agents Chemother*, 2003, 47, 2186-92.

Wing B.A. Huang E.S. Analysis and mapping of a family of 3'-coterminal transcripts containing coding sequences for human cytomegalovirus open reading frames UL93 through UL99. *J. Virol.*, 1995, 69, 1521-31.

Winston D.J., Young J.A., Pullarkat V., Papanicolaou G.A., Vij R., Vance E., *et al.* Maribavir prophylaxis for prevention of cytomegalovirus infection in allogeneic stem cell transplant recipients: a multicenter, randomized, double-blind, placebo-controlled, dose-ranging study. *Blood*, 2008, 111, 5403-10.

Wolf D.G., Courcelle C.T., Prichard M.N. Mocarski E.S. Distinct and separate roles for herpesvirus-conserved UL97 kinase in cytomegalovirus DNA synthesis and encapsidation. *PNAS*, 2001, 98, 1895-900.

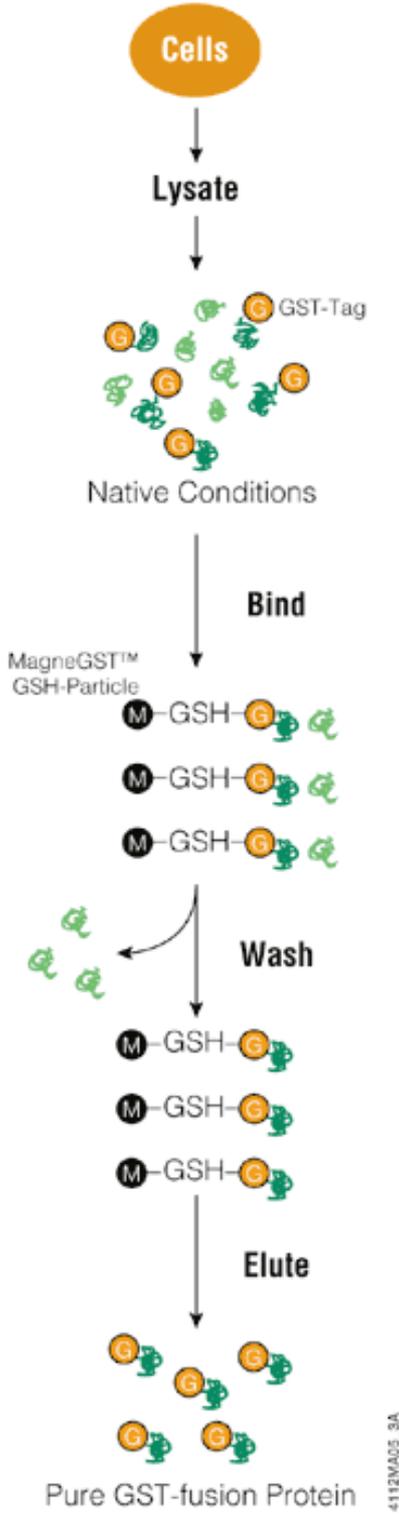
Wolf D.G., Smith A.A., Lee D.L., Freeman W.R., Flores-Aguilar M. Spector S.A. Mutations in human cytomegalovirus UL97 gene confer clinical resistance to ganciclovir and can be detected directly in patient plasma. *J. Clin. Invest.*, 1995, 95, 257-63.

Ye L.B. Huang E.S. In vitro expression of the human cytomegalovirus DNA polymerase gene: effects of sequence alterations on enzyme activity. *J Virol*, 1993, 67, 6339-47.

Zedtwitz-Liebenstein K., Jaksch P., Bauer C., Popow T., Klepetko W., Hofmann H., *et al.* Association of cytomegalovirus DNA concentration in epithelial lining fluid and symptomatic cytomegalovirus infection in lung transplant recipients. *Transplantation*, 2004, 77, 1897-9.

Annexe

Annexe 1 : Technique de purification des protéines à l'aide de billes magnétiques du kit MagneGST™ Protein Purification System (Promega).



Résumé

Résistance du cytomégalovirus aux antiviraux : de la clinique à la structure

Le cytomégalovirus (CMV) est un virus ubiquitaire, peu pathogène chez l'immunocompétent mais qui représente un problème majeur pour les transplantés d'organes et les greffés de moelle osseuse. Les thérapeutiques actuellement disponibles (ganciclovir, cidofovir et foscarnet) sont insatisfaisantes du fait de leur toxicité et de l'émergence de mutations conférant une résistance à ces molécules au sein du gène de la protéine cible, l'ADN polymérase pUL54, ou du gène de la protéine nécessaire à l'activation du ganciclovir: la phosphotransférase pUL97.

La première partie de notre travail a porté sur l'étude génotypique et phénotypique des mutations de résistance du CMV aux antiviraux actuellement disponibles à partir d'une cohorte multicentrique de patients transplantés. Ces études ont permis de mettre en évidence de nouvelles mutations de résistance dans *UL97* et *UL54* et de mieux comprendre les facteurs influençant l'émergence de résistance en fonction des différents profils de patients.

Dans un deuxième temps, nous avons analysé, à partir du principe de génotypage développé pour les cibles des antiviraux traditionnels, la conservation inter-espèces et la structure primaire de protéines cibles de nouveaux antiviraux. Cette approche nous a permis de déterminer des domaines fonctionnels pour chaque protéine et de prédire leur structure secondaire afin de mieux comprendre leur fonction et les mécanismes moléculaires des résistances. Ces nouveaux antiviraux inhibent deux étapes spécifiquement virales, l'encapsidation et la sortie des nucléocapsides hors du noyau. Il s'agit de dérivés benzimidazolés D-ribonucléosides, 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.

Mots-clés : cytomégalovirus, antiviraux, résistance, transplantation, benzimidazolés

Abstract

Cytomegalovirus resistance to antivirals : from patients to protein structure studies

The cytomegalovirus (CMV) is a largely widespread virus, with low pathogenicity in immunocompetent but represents a major problem for organ and bone marrow transplant recipients. The currently available therapies (ganciclovir, cidofovir and foscarnet) are unsatisfactory because of their toxicity and the emergence of mutations conferring resistance to these antivirals within the gene of the target protein, DNA polymerase pUL54, or gene protein necessary for activation of ganciclovir: pUL97 phosphotransferase.

The first part of our work has focused on the phenotypic and genotypic studies of currently available antivirals resistance mutations from a multicenter cohort of transplant recipients. These studies highlight new resistance mutations in *UL97* and *UL54* and led to better understand the factors influencing the emergence of resistance based on different patient profiles.

In a second step, we have analyzed, from the principle of genotyping developed for traditional antiviral targets, the inter-species conservation and the primary structure of protein targets for new antiviral drugs. This approach allowed us to identify functional domains for each protein and to predict their secondary structure to better understand their function and molecular mechanisms of resistance. These new antiviral drugs inhibit two specific viral steps: encapsidation and nuclear egress of the capsid. The benzimidazole D-ribonucleoside derivatives, which target specific proteins involved in encapsidation of viral DNA (pUL56, pUL89, and pUL104), and a benzimidazole L-ribonucleoside derivative, the maribavir, which inhibits extranuclear export of neoformed capsids by a mechanism involving the phosphotransferase protein pUL97 and pUL27.

Key-words: cytomegalovirus, antiviral, resistance, transplant recipient, benzimidazoles