

# UNIVERSITE DE LIMOGES

ECOLE DOCTORALE Science-Technologie-Santé

Faculté de Médecine

Année 2011

Thèse N°

Thèse

Pour obtenir le grade de

DOCTEUR DE L'UNIVERSITE DE LIMOGES

Discipline : Biologie - Sciences - Santé

Présentée et soutenue par

Sébastien COTIN

Le 26 septembre 2011

## Cytomégalovirus humain, mutations de résistances, et nouveaux antiviraux

Thèse dirigée par le Pr Sophie ALAIN

Jury :

Mr le Pr François	DENIS	Président
Mme le Pr Marie-Edith	LAFON	Rapporteur
Mr le Pr Jacques	IZOPET	Rapporteur
Mme le Dr Marie-Christine	MAZERON	Examineur
Mme le Pr Marie	ESSIG	Examineur
Mme le Pr Sophie	ALAIN	Directeur de thèse

## Remerciements

A **Monsieur le Professeur François Denis**, de me faire l'honneur de présider ce jury après ces cinq années pendant lesquelles il a été pour moi un véritable modèle et une source d'inspiration. Il m'a soutenu dans mes projets en m'a prodigué les plus précieux des conseils. Qu'il trouve ici l'expression de tout mon respect et mon admiration.

A **Madame le Professeur Sophie Alain**, pour m'avoir encadré depuis mon stage de master jusqu'à la fin de ma thèse et pour m'avoir associé aux différents projets du CNR Cytomégalovirus. Qu'elle reçoive toute ma gratitude pour sa patience, sa gentillesse, sa compréhension son soutien sans faille dans mes projets et ses précieux conseils.

A **Monsieur le Professeur Jacques Izopet**, pour avoir accepté de juger ce travail et de me faire l'honneur de participer au jury de cette thèse. Qu'il trouve ici l'expression de tout mon respect.

A **Madame le Professeur Marie-Edith Lafon**, pour me faire l'honneur de juger ce travail et de participer à ce jury de thèse. Qu'elle soit assurée de mon profond respect.

A **Madame le Docteur Marie-Christine Mazon**, pour avoir accepté de juger ce travail et pour me faire l'honneur de participer au jury de cette thèse. Qu'elle soit ici vivement remerciée pour l'accueil qu'elle m'a réservé lors de mon déplacement à Paris et pour ses conseils avisés lors de nos rencontres.

A **Madame le Professeur Marie Essig**, pour avoir accepté d'être examinatrice de ce travail et pour avoir accepté de faire partie de ce jury de thèse. Qu'elle soit assurée de tout mon respect.

A **Madame le Professeur Marie-Cécile Ploy**, pour m'avoir donné l'opportunité de pouvoir réaliser mon stage de master et ma thèse dans son équipe de recherche. Qu'elle soit ici remerciée pour son dynamisme, son soutien et de ses encouragements.

A **la région Limousin**, pour le financement des trois premières années de ce travail.

...une thèse c'est aussi plusieurs années passées en compagnie de personnes avec qui on partage les bons comme les mauvais moments ; alors pour votre présence, pour la précieuse amitié que l'on partage ou simplement en mémoire des moments passés ensemble, merci à :

- Fadi Saade, mon si précieux ami, mon beau-frère et bien plus encore...
- Emilie Guérin, Thomas Jové, Sébastien Hantz, Olivier Barraud et Martine Gatet avec qui j'ai passé cinq années incroyables.
- Lucie Morère, Raphael Cazal, Aurore Tabesse, Thibault Stalder, Emilie Strugeon. Que de bons moments ensemble...
- Gaël Champier, Stéphanie Stupfler, Aurélie Faisant, Anthony Couvreur, Anne Delcombel, Jérôme Grosjean, Sandra Da Re, Sophie Rahérison, Tassadit Mazar et tous les stagiaires qui d'aventure sont passés dans le laboratoire.

Enfin merci à ma famille et mes amis sans qui ma vie serait bien vide en particulier mon épouse, mes parents, ma grand-mère, Frédéric Tatarenko, Ariane Ludinard, Luce-Perrine Yemadjé et merci aussi à tous ceux que j'aurais par mégarde oubliés sur cette page.

A mes parents et beaux-parents

Merci pour votre soutien inconditionnel et l'amour que vous me portez,

A Fida,

Merci ma chère épouse pour ta patience et ta tendresse,

## Liste des abréviations

<b>ADN</b>	Acide désoxyribonucléique
<b>ACV</b>	Aciclovir
<b>AMV</b>	Alfalfa mosaic virus
<b>AP</b>	<i>Assembly protein</i> ou protéine d'assemblage
<b>ARN</b>	Acide ribonucléique
<b>ARNm</b>	ARN messenger
<b>BAC</b>	<i>Bacterial Artificial Chromosome</i> ou chromosome artificiel bactérien
<b>BDCRB</b>	2-bromo-5,6-dichloro-1(β-D-ribofuranosyl)benzimidazole
<b>CC<sub>50</sub></b>	Concentration cytotoxique 50%
<b>CDV</b>	Cidofovir
<b>CI<sub>50</sub></b>	Concentration Inhibitrice 50%
<b>Cmax</b>	Concentration maximale plasmatique
<b>CMV</b>	Cytomégalovirus
<b>CMVH</b>	Cytomégalovirus humain
<b>D+/-</b>	Donneur séropositif/séronégatif
<b>DB</b>	<i>Dense body</i> ou corps dense
<b>DE</b>	<i>Delayed early</i> ou précoce retardé
<b>DMSO</b>	Diméthylsulfoxyde
<b>DO</b>	Densité optique
<b>DTT</b>	Dithiothréitol
<b>E</b>	<i>Early</i> ou précoce
<b>EBV</b>	<i>Epstein Barr Virus</i> ou virus d'Epstein Barr
<b>ECP</b>	Effet Cytopathique
<b>EGF</b>	<i>Epidermal growth factor</i> ou facteur de croissance épidermique
<b>EGFR</b>	<i>Epidermal growth factor receptor</i> ou récepteur du facteur de croissance épidermique
<b>ER</b>	<i>Endoplasmic reticulum</i> ou réticulum endoplasmique
<b>Exo</b>	Exonucléasique
<b>g</b>	Grammes
<b>GB</b>	<i>Golgi body</i> ou vésicule golgienne
<b>gB/H/M/N</b>	Glycoprotéine B/H/M/N
<b>gC</b>	<i>Glycoprotein complex</i> ou complexe glycoprotéique

<b>GCV</b>	Ganciclovir
<b>gp</b>	Glycoprotéine
<b>GVH</b>	<i>Graft versus host</i> ou greffon contre l'hôte
<b>h</b>	heure
<b>HHV</b>	<i>Human herpes virus</i> ou herpesvirus humain
<b>HPMPA</b>	hydroxyl-2-phosphonomethoxy-propyladenine
<b>HSV</b>	<i>Herpes simplex virus</i> ou virus herpès simplex
<b>ICTV</b>	<i>International committee on taxonomy of viruses</i>
<b>IE</b>	<i>Immediate early</i> ou très précoce
<b>IFN</b>	Interféron
<b>IgG/M</b>	Immunoglobuline G/M
<b>IL</b>	Interleukine
<b>INM</b>	<i>Inner nuclear membrane</i> ou membrane nucléaire interne
<b>IPTG</b>	Isopropyl $\beta$ -D-1-thiogalactopyranoside
<b>j</b>	jour
<b>Kb</b>	Kilobase
<b>Kpb</b>	Kilopaire de Bases
<b>L</b>	<i>Late</i> ou tardif
<b>LB</b>	<i>Lysogeny broth</i>
<b>LCR</b>	Liquide céphalorachidien
<b>LIR/IRL</b>	<i>Long Internal Repeat</i>
<b>LTR/TRL</b>	<i>Long Terminal Repeat</i>
<b>MBV</b>	Maribavir
<b>McHV1</b>	Herpesvirus 1 de macaque
<b>mCP</b>	<i>minor capsid protein</i> ou protéine mineure de la capside
<b>MCP</b>	<i>major capsid protein</i> ou protéine majeure de la capside
<b>mL</b>	Millilitre
<b>MT</b>	Microtubule
<b>nm</b>	Nanomètre
<b>NP</b>	<i>Nuclear pore</i> ou pore nucléaire
<b>pac</b>	<i>Cis-acting packaging element</i>
<b>PAGE</b>	<i>Polyacrylamide gel electrophoresis</i> ou électrophorèse en gel de polyacrylamide
<b>pb</b>	paires de bases
<b>PCR</b>	<i>Polymerase Chain Reaction</i> ou réaction de polymérisation en chaîne

<b>PFA</b>	Foscarnet
<b>Pol</b>	Polymérase
<b>PVDF</b>	Polyfluorure de vinylidène
<b>R+/-</b>	Receveur séropositif/séronégatif
<b>Rb</b>	Rétinoblastome
<b>SCP</b>	<i>Smallest capsid protein</i> ou petite protéine de capside
<b>SDS</b>	Sodium dodecyl-sulfate
<b>SIR/IRS</b>	<i>Short Internal Repeat</i>
<b>SIDA</b>	Syndrome d'immunodéficience acquise
<b>SNC</b>	Système nerveux central
<b>TORCH</b>	<i>Toxoplasmosis and other infections including syphilis rubeola CMV and HSV</i>
<b>UL</b>	Segment unique long (unique long)
<b>US</b>	Segment unique short (unique court)
<b>UTP</b>	Uracile triphosphate
<b>VCV</b>	Valaciclovir
<b>VGCV</b>	Valganciclovir
<b>VIH</b>	Virus de l'immunodéficience humaine
<b>VP</b>	<i>Virus particle</i> ou particule virale
<b>VZV</b>	Virus de la varicelle et du zona
<b>µg</b>	Microgrammes
<b>°C</b>	Degré Celsius

## Liste des figures et tableaux

Figure 1	: Structure des virions des <i>Herpesviridae</i>	page 15
Figure 2	: Taxonomie et phylogénie des principaux herpesvirus	page 17
Figure 3	: Représentation schématique du génome du CMVH	page 22
Figure 4	: Le cycle de réplication du CMV	page 25
Figure 5	: Réplication et encapsidation de l'ADN viral néo synthétisé	page 27
Figure 6	: Aspect caractéristique en « œil de hibou » de cellules infectées par le CMV	page 31
Figure 7	: Physiopathologie de l'infection à CMVH	page 34
Figure 8	: Les inhibiteurs de l'ADN polymérase virale	page 43
Figure 9	: Cartographie du gène <i>UL97</i>	page 49
Figure 10	: Effet cytopathique caractéristique de l'inhibition d' <i>UL97</i> par le MBV	page 50
Figure 11	: Cartographie du gène <i>UL54</i>	page 52
Figure 12	: Structure des inhibiteurs de la fusion membranaires	page 60
Figure 13	: Structure chimique du composé CFI02	page 61
Figure 14	: Structure chimique du cidofovir et des deux de ses dérivés ester lipidiques	page 64
Figure 15	: Formule chimique du composé ZSM-I-62	page 65
Figure 16	: Inhibiteurs de phase tardive du cycle de réplication du CMVH	page 69
Figure 17	: Les deux antipaludéens principaux présentant une activité anti-CMV	page 70
Figure 18	: Structure de base des flavonoïdes	page 71
Figure 19	: Modèle d'interaction d' <i>UL27</i> avec les protéines cellulaires	page 123
Figure 20	: Réaction chimique du test d'activité kinase	page 131
Figure 21	: Clonage d' <i>UL97</i> dans pGEM11-ZF(+)/AMV	page 132
Figure 22	: Mutagénèse sur <i>UL97</i>	page 133
Figure 23	: Western blotting réalisé pour révéler la production d' <i>UL97</i>	page 134
Figure 24	: Phosphorylation de l'histone H <sub>2</sub> B par <i>UL97</i> native ou mutée	page 135
Figure 25	: Détermination de la concentration de GCV à utiliser	page 136
Figure 26	: Phosphorylation du GCV par <i>UL97</i> native ou mutée	page 137
Figure 27	: Structure prédictive de la protéine <i>UL97</i>	page 141
Figure 28	: Structure chimique des deux benzimidazolés étudiés	page 172
Tableau 1	: Mutations dans <i>UL97</i> conférant une résistance au GCV	page 55
Tableau 2	: Mutations de résistance d' <i>UL54</i> et résistance aux antiviraux	page 57
Tableau 3	: Essais de synergie avec le MBV	page 168
Tableau 4	: Cytotoxicité des dérivés benzimidazolés étudiés	page 173
Tableau 5	: EAV sur deux dérivés benzimidazolés et synergie avec le MBV	page 173
Tableau 6	: Essais antiviraux du MBV sur trois isolats de CMVH	page 174



# Table des matières

<b>Introduction.....</b>	<b>p11</b>
<b>Etude Bibliographique.....</b>	<b>p14</b>
<b>I. Le cytomégalo virus un herpesvirus particulier</b>	<b>p15</b>
1. L'ordre des Herpesvirales	p15
2. Origine des herpesvirus	p16
3. Caractéristiques communes aux <i>Herpesviridae</i>	p17
4. <i>Betaherpesvirinae</i>	p18
5. Le CMVH	p18
a. Histoire	p18
b. Structure du virion	p19
c. Le génome	p22
d. Cycle réplcatif du CMVH	p24
<b>II. L'infection à CMVH</b>	<b>p29</b>
1. Epidémiologie du CMV	p29
2. Physiopathologie	p31
a. Immunologie	p31
b. Primo infection et virémie	p33
c. Latence et réactivation	p35
d. Manifestations cliniques	p35
e. Greffes et infections à CMV	p39
3. Prise en charge thérapeutique	p41
a. Molécules antivirales	p41
b. Traitement des infections à CMV	p45
<b>III. Mécanismes de résistance du CMVH</b>	<b>p48</b>
1. Les gènes ciblés par les molécules antivirales	p48
a. La kinase UL97	p48
b. UL54 l'ADN polymérase virale	p51
2. Les mutations liées à la résistance	p53
a. Les mutations identifiées après culture virale	p53
b. Mutations observées <i>in vivo</i> après thérapie antivirale	p54
<b>IV. Perspectives thérapeutiques</b>	<b>p59</b>
1. Inhibiteurs de l'attachement du virus	p59
2. Inhibiteurs de la synthèse de l'ADN	p61
a. CDV, CMX001 et autres analogues de nucléosides phosphates	p61
b. Cyclopropavir et autres analogues du methylenecyclopropane	p64
3. Inhibiteurs du clivage et de l'empaquetage de l'ADN viral	p65
a. Les dérivés benzimidazolés	p65
b. BAY 38-4766	p66
c. AIC246	p67
4. Inhibiteurs de la protéine kinase UL97	p67
5. Les médicaments déjà utilisés dans d'autres pathologies	p68
a. Antipaludéens	p68
b. Leflunomide	p70

c. Sirolimus et everolimus	p70
6. Autres composés naturels antiviraux, les flavonoïdes	p71
7. Perspectives vaccinales	p72
a. Vaccins vivant atténués	p72
b. Vaccins protéiques	p72
<b>Objectifs.....</b>	<b>p74</b>
<b>Etude Expérimentale.....</b>	<b>p77</b>
<b>I. Etude des mutations de résistance d'UL97 et d'UL54</b>	<b>p78</b>
1. Surveillance de la résistance du CMV chez les patients transplantés	p78
Publication 1 : <i>Drug-resistant cytomegalovirus in transplant recipients: a French cohort study</i>	p79
2. Etude de mutations uniques sur UL54 par la technologie des BAC	p94
Publication 2 : <i>Characterization of two original human cytomegalovirus drug resistant isolates</i>	p96
<b>II. Mutations de résistances au MBV et relations structure-fonction des protéines UL97 et UL27</b>	<b>p112</b>
1. Importance de la protéine UL27	p112
Publication 3 : <i>Conserved domains and structure prediction of human cytomegalovirus UL27 protein</i>	p114
2. Développement d'un test d'activité kinase dans le cadre de l'étude d'UL97	p124
a. Matériel et méthode	p124
b. Résultats	p131
c. Discussion	p137
<b>III. Recherche de nouveaux anti-CMV</b>	<b>p142</b>
1. Les flavonoïdes comme anti-CMV	p142
Publication 4 : <i>Eight flavonoids and their potential to inhibit human cytomegalovirus replication</i>	p143
2. Etude complémentaire sur les nouveaux antiviraux	p172
<b>Discussion.....</b>	<b>p175</b>
<b>Références Bibliographiques.....</b>	<b>p180</b>
<b>Travaux Annexes.....</b>	<b>p205</b>
Publication 5 : <i>Direct genotyping of cytomegalovirus envelope glycoproteins from toddler's saliva samples</i>	p206
Publication 6 : <i>Résistance du cytomégalovirus aux antiviraux</i>	p213

# Introduction

Le cytomégalovirus (CMV) est virus à ADN double brin membre de la famille des *Herpesviridae*. Dans cette famille on retrouve l'herpès simplex virus de type 1 (HSV-1 ou

HHV-1) et l'herpès simplex virus de type 2 (HSV-2 ou HHV-2), le varicelle zona virus (VZV), et les herpes virus humain 6, 7 et 8 (HHV-6, HHV-7 et HHV-8). Le CMV partage de nombreux attributs avec les autres herpesvirus, notamment au niveau du génome, de la structure des virions et de la capacité d'induire une infection persistante à l'état latent. Le CMV a le plus grand génome parmi les herpesvirus et sa réplication peut se décomposer en plusieurs étapes dites « très précoce, précoce et tardive » et sont liées à l'expression successive des gènes viraux au cours du cycle de réplication du virus après l'infection. L'ADN viral se réplique selon le modèle du cercle roulant et le CMV humain se réplique uniquement dans les cellules humaines et particulièrement bien en culture sur fibroblastes.

Au moins 50% de la population mondiale a déjà été exposée au virus avec une prévalence plus ou moins forte en fonction des pays, et des classes socio-économiques. L'âge moyen d'infection varie en fonction des pays avec préférentiellement une transmission pendant l'enfance dans les pays en voie de développement et une prévalence qui reste inférieure à 50% chez les jeunes adultes dans les pays développés.

Le CMV se transmet par contact étroit avec les fluides corporels d'un individu excréteur du virus (salive, sperme, sang, lait maternel) et cause le plus souvent une infection asymptomatique après laquelle il persiste à vie, à l'état latent chez l'hôte, et garde la possibilité de se réactiver. Les infections symptomatiques à CMV peuvent résulter d'une réactivation ou d'une primo-infection, et se produisent le plus souvent chez les sujets immunodéprimés, qui sont des patients atteints du VIH ou des patients transplantés traités par immunosuppresseurs. Ces infections peuvent se propager dans tous les organes et peuvent se manifester sous forme de fièvre, de pneumonies, d'hépatites, d'encéphalites, myélites, colites, rétinites ou neuropathies. Enfin il peut aussi se transmettre au fœtus pendant la grossesse à travers le placenta faisant de ce virus la première cause d'infection congénitale d'origine virale.

Le ganciclovir (GCV), sa pro-drogue le valganciclovir (VGCV), le cidofovir (CDV), le foscarnet (PFA) et le valaciclovir (ACV) uniquement donné en prophylaxie, sont les molécules actuellement utilisées en pratique clinique pour lutter contre les infections à CMV. Elles agissent toutes sur la réplication de l'ADN viral en interférant avec l'activité polymérasique de l'ADN polymérase du CMV. Ces molécules ont déjà montré leurs limites puisqu'elles ne sont pas dénuées de toxicité, ceci limitant grandement leur utilisation chez les patients, notamment les transplantés de rein (toxicité néphrologique importante) et interdit totalement leur utilisation chez la femme enceinte, ne laissant aucune alternative à la prévention de l'infection congénitale. De plus, le virus est en mesure de contourner l'effet de

ces molécules, et un grand nombre de mutations de résistance, sur plusieurs gènes viraux, ont pu être décrites après traitements au long cours. Ces mutations sont principalement localisées sur le gène *UL97* ou sur le gène *UL54*, parfois sur les deux et certaines mutations ou combinaisons de mutations entraînent des multi résistances qui aboutissent parfois à l'impasse thérapeutique. *UL97* code une kinase capable de phosphoryler un grand nombre de substrats et elle est particulièrement responsable de la primo-phosphorylation du GCV indispensable à l'activité antivirale de cette molécule. Le deuxième gène code l'ADN polymérase virale. L'identification et la connaissance de ces mutations de résistances représentent un enjeu de taille, qui outre les avancées en termes de recherche fondamentale sur le virus, implique une recherche permanente de la meilleure prise en charge possible du patient.

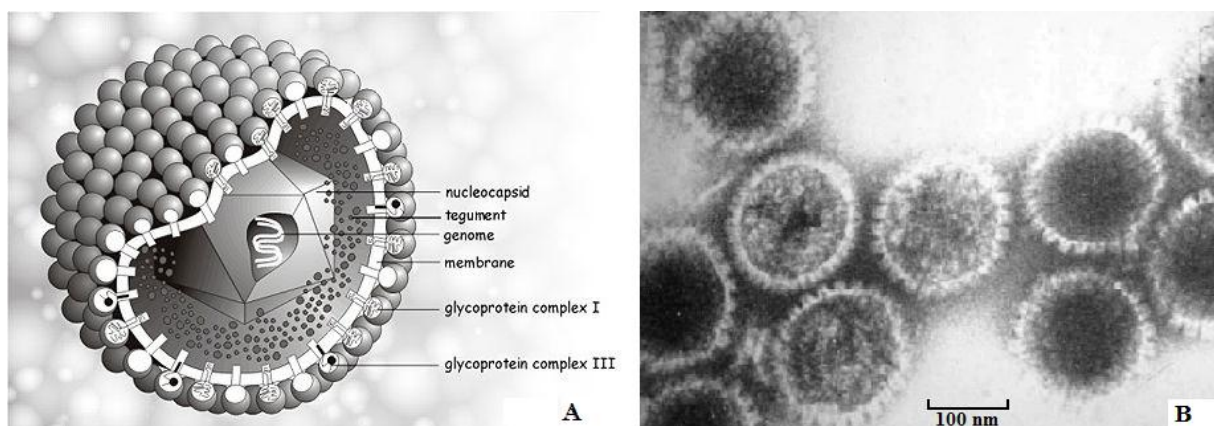
Toutes ces limites dans le traitement des infections à CMV, conjuguées à l'absence de vaccin font du développement de nouvelles thérapies anti-CMV une priorité. Le criblage systématique d'un grand nombre de molécules ou de familles de molécules par les laboratoires de recherche ont permis jusqu'à présent d'identifier plusieurs dizaines de composés actifs *in vitro* et inhibant la réplication du CMVH. En prenant en compte les résultats d'études plus approfondis sur certaines de ces molécules concernant leur spécificité, leur toxicité, leur biodisponibilité, et leur pharmacocinétique une poignée d'entre elles seulement semblent être de bons candidats et quatre sont réellement aujourd'hui en phase d'essais cliniques laissant encore quelques beaux jours devant la recherche de nouvelles thérapies anti-CMV.

# **Etude Bibliographique**

# I. Le cytomégalovirus

## 1. L'ordre des Herpesvirales

Historiquement, l'appartenance d'un virus à la famille des *Herpesviridae* était relative à la structure des virions. Un virion caractéristique de cette famille étant composé, de l'intérieur vers l'extérieur : d'une capsid icosaédrique formée de 162 capsomères renfermant le génome viral qui se présente sous la forme d'une molécule d'ADN linéaire bi caténaire, longue de 124 à 230 kb ; d'une substance amorphe appelée tégument qui contient de nombreuses protéines virales et qui entoure la nucléocapside ; et d'une enveloppe phospholipidique d'origine cellulaire dans laquelle sont enchâssées de nombreuses glycoprotéines (Figure 1). Avec cette classification, se sont retrouvés regroupés de nombreux virus infectants des organismes aussi variés que le bivalve ou l'humain. Aujourd'hui les progrès en matière de séquençage des génomes et en phylogénie ont permis aux experts du groupe d'étude sur les herpesvirus de l'ICTV (International Committee on Taxonomy of Viruses) de créer un nouvel ordre : les *Herpesvirales* qui compte trois familles parmi lesquelles on trouve les *Herpesviridae* qui regroupent les herpesvirus de mammifères, oiseaux et reptiles, ainsi que deux nouvelles familles : les *Alloherpesviridae* qui sont des herpesvirus de poissons et d'amphibiens, et les *Malacoherpesviridae* qui sont des herpesvirus de bivalves (McGeoch et al., 2006).



**Figure 1 : Structure des virions des *Herpesviridae*** (d'après Gandhi et Khanna, 2004 et photographie d'Howard Sochurek).

A : Représentation schématique de la structure d'un virion d'*Herpesviridae*.

B : Virions de HSV-1 en microscopie électronique en transmission

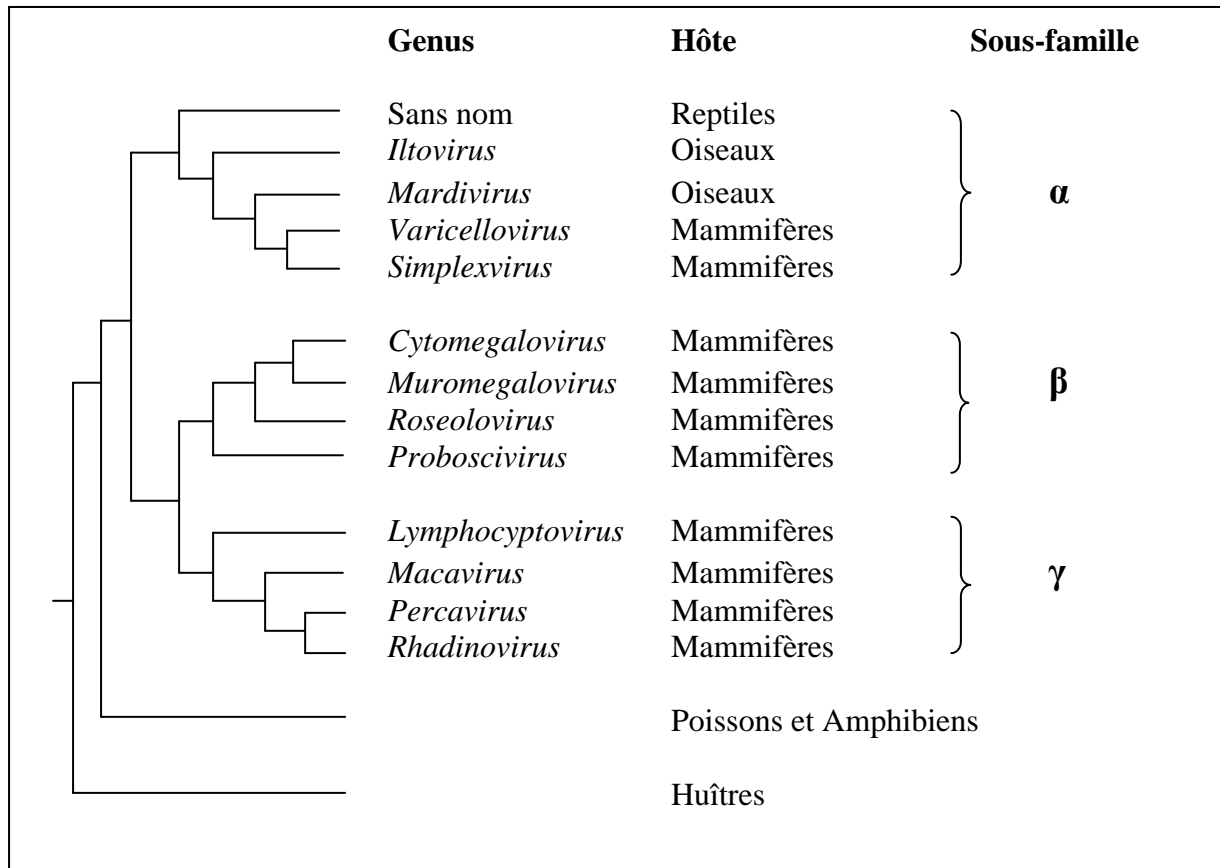
## 2. Origine des herpesvirus

On trouve des herpesvirus de façon récurrente au sein du règne animal et pratiquement toutes les espèces sont susceptibles d'être infectées par au moins un herpesvirus. Ces virus partagent un certain nombre de caractéristiques structurales et génomiques avec en particulier, un cycle de réplication court, une faible excrétion des virions qui demeurent associés aux cellules et une étroite spécificité d'hôte. Le nombre d'herpesvirus capables d'infecter plus d'une espèce animale est assez faible et en général, dans ce cas, le virus possède une espèce hôte naturelle chez qui il est peu pathogène (réservoir sauvage), et une espèce hôte domestique chez qui il provoque une maladie parfois grave. Par exemple, le McHV1 (herpesvirus 1 de macaque) est transmissible à l'homme et provoque dans la majorité des cas des encéphalomyélites fatales (Estep et al., 2010). D'autre part beaucoup d'espèces sont susceptibles de servir d'hôte à plusieurs herpesvirus.

L'origine historique des herpesvirus demeure un sujet de controverse. Les similitudes avec les mécanismes de réplifications des phages à ADN ne peuvent s'expliquer uniquement par les théories d'évolutions convergentes et cela laisse penser que les ancêtres des herpesvirus datent des premières étapes de l'évolution dans l'histoire du parasitisme. S'ajoutent à cela certains éléments au sein des génomes des virus de cette famille qui sont très conservés, comme par exemple le gène codant la terminase UL15 de HSV-1 et pour lequel on retrouve des homologues chez tous les herpesvirus ainsi que des fonctions homologues codées au sein du génome de bactériophages de la famille des *Caudovirales* (Davison, 2002). De plus, il existe entre herpesvirus et bactériophages un autre point commun, en effet, ils partagent au niveau de leurs capsides une structure particulière unique composée de trois hélices- $\alpha$  et deux feuillettes- $\beta$  (Baker et al., 2005). L'ancêtre commun à tous les herpesvirus a permis l'émergence de trois lignées très individualisées avec une première lignée comprenant les alpha-, beta- et gammaherpesvirus, la deuxième comprenant les herpesvirus d'huîtres et la troisième celle des poissons et amphibiens (Figure 2). Les analyses phylogénétiques, bien que parfois complexes à interpréter, ont fait naître plusieurs théories quant à l'histoire des herpesvirus. Certaines études tendent à démontrer que les virus de la première lignée, qui infectent les oiseaux et les mammifères, se seraient diversifiés en trois sous familles avant que ces espèces hôtes se soient répandues sur la planète et que les alpha-herpesvirus seraient apparus en premier (McGeoch et al., 1995). Il a aussi été proposé que HHV-6 serait proche d'un éventuel ancêtre commun et que tous les alpha-herpesvirus seraient apparus relativement récemment (Karlin et al., 1994). Dans tous les cas, il est admis que la spéciation de tous les



virus de cette famille s'est effectuée en parallèle de celle des espèces hôtes (Moore et al., 1996).



**Figure 2 : Taxonomie et phylogénie des principaux herpesvirus** (d'après Mocarski et al., 2007).

(Les branches ne sont pas proportionnelles aux distances phylogéniques)

### 3. Caractéristiques communes aux *Herpesviridae*

Les Herpesviridae partagent quatre propriétés biologiques communes :

- Ils partagent de façon spécifique, avec des différences minimales d'un virus à l'autre, un large éventail d'enzymes impliquées dans le métabolisme des acides nucléiques (thymidine kinase, thymidilate synthetase, dUTPase, ribonucléotide réductase), dans la synthèse de l'ADN (ADN polymérase, hélicase, primase) et dans la maturation protéique (protéine kinase).

- Pour tous ces virus la synthèse de l'ADN viral ainsi que l'assemblage de la capside se font dans le noyau de la cellule hôte et la maturation finale du virion a lieu dans le cytoplasme de cette même cellule.
- La production de virions infectieux s'accompagne toujours de la destruction de la cellule hôte infectée, ce processus pouvant être plus ou moins rapide.
- Ces virus sont capables de persister de façon durable, à l'état latent dans certaines cellules de l'organisme animal hôte. Dans cet état latent, seuls quelques gènes viraux continuent de s'exprimer, mais le génome dans son ensemble garde la capacité de se répliquer et de causer une infection en cas de réactivation. Les mécanismes moléculaires de cette réactivation sont encore mal connus et semblent varier d'un virus à l'autre.

#### **4. *Betaherpesvirinae***

La caractéristique principale de cette sous famille, bien que non exclusive à celle-ci, est son étroite spécificité d'hôte. On peut aussi noter que les cycles de répliquions de ces virus sont longs et l'infection progresse lentement en culture. Fréquemment les cellules infectées grossissent (on parle de cytomégalie). Ces virus peuvent persister à l'état latent entre autre, au niveau des glandes sécrétoires, des tissus lymphoïdes et des reins (Mocarski et Shenk, 2007). Le cytomégalovirus humain est un *Betaherpesvirinae*.

#### **5. Le CMVH**

##### **a. Historique**

En raison du grand nombre de pathologies liées à une infection à cytomégalovirus, il est aujourd'hui reconnu que ces virus sont à eux seuls une sous famille, médicalement identifiée (Davison et al., 2003). La forme la plus sévère des syndromes congénitaux associés à une infection à CMV est appelée maladie des inclusions cytomégaliqes et est identifiée dès le début des années 1930 à partir de tissus prélevés sur des nourrissons. Il s'agit d'une maladie infectieuse reconnaissable à sa cytopathologie caractéristique dite en « œil de hibou » au niveau des glandes salivaires, du foie, de la rate, des reins, du pancréas et de la thyroïde. Au début des années 1950 cette maladie commence à être diagnostiquée sur la base de présence dans les urines de cellules présentant des inclusions. L'origine virale fut supposée à partir

d'observations basse résolution par microscopie électronique de particules d'environ 100nm. Margaret Smith, qui était déjà parvenue à isoler le CMV murin connu à l'époque sous le nom de « virus des glandes salivaires de souris » finit par isoler le CMVH à partir d'urine de nouveaux nés victimes de cette maladie (Ho, 1991). Au début des années 1970, il est déjà clairement établi que :

- La réplication du virus ne peut se faire qu'au sein des cellules de l'espèce hôte d'origine
- Des virus similaires peuvent être facilement isolés à partir d'une large variété de mammifères
- La cytopathologie suit un tissu distinct et est identifiable au sein de types cellulaires particuliers de ce tissu.

Une fois le lien établi entre l'importance de la transmission trans-placentaire et les dommages neurologiques chez le nouveau-né, la compréhension des maladies congénitales à CMV n'a cessé de s'améliorer. La mise en évidence de l'impact sur les patients des séquelles liées à ces maladies, notamment la surdité, a conduit à faire du contrôle de cette maladie à l'aide d'un vaccin une priorité (Arvin et al., 2004 ; Plotkin, 2004).

#### b. Structure du virion (Mocarski et Shenk, 2007)

- L'enveloppe

Elle est constituée d'une bicouche lipidique, dérivée du bourgeonnement des membranes internes cytoplasmiques de la cellule infectée. Elle porte des glycoprotéines virales et le CMV présente la particularité de coder potentiellement 60 glycoprotéines différentes. 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 la cible privilégiée des cellules CD8<sup>+</sup> et CD4<sup>+</sup>.

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

- Le tégument

Le tégument 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 (UL32) et pp65 (UL83). La protéine UL83 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 tégument.

Les protéines UL99 (pp28), UL82 (pp71), UL98a et UL97 comptent aussi parmi les protéines du tégument. La phosphoprotéine UL82 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 UL97, 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 UL97 dans le paragraphe portant sur la résistance du CMVH aux antiviraux.

- 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 UL86 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 UL80 génère, après trois clivages post-traductionnels des protéines assurant des fonctions distinctes mais complémentaires au sein de la capsid. La protéine UL80.5 ou protéine AP (*Assembly Protein*) est constituée de la portion C-terminale d'UL80 suite à un clivage contrôlé par la protéase assembleine. L'assembleine ou UL80a est constituée de l'extrémité N-Terminale d'UL80 libérée par un clivage autocatalytique. Un troisième clivage permet l'inhibition de l'activité protéasique d'UL80a. Ce mécanisme complexe de maturation des dérivés d'UL80 aboutit à la formation d'un constituant majeur de la capsid : la protéine AP. Cette dernière constitue une structure en anneau au sein de la capsid qui aurait un rôle dans l'étape d'encapsidation de l'ADN viral.

- Les protéines de l'hôte

Au moins 71 protéines humaines ont été identifiées à ce jour dans la particule virale du CMVH. Parmi ces enzymes cellulaires on retrouve la  $\beta$ 2-microglobuline, des phosphatases, la topoisomérase II, l'actine. Ces protéines pourraient jouer un rôle dans la fixation du virion à la surface de la cellule hôte, dans la translocation de la nucléocapsid virale à l'intérieur de la cellule ou dans l'enveloppement des nouvelles particules virales. Deux phénomènes peuvent sous-entendre l'importance de ces protéines : la synthèse de petites quantités d'ADN viral en présence d'inhibiteurs de l'ADN polymérase virale suggérant l'utilisation d'enzymes cellulaires de réplication et l'activité kinase de pp65 qui nécessiterait la présence d'une enzyme cellulaire associée (Roby et Gibson, 1986).

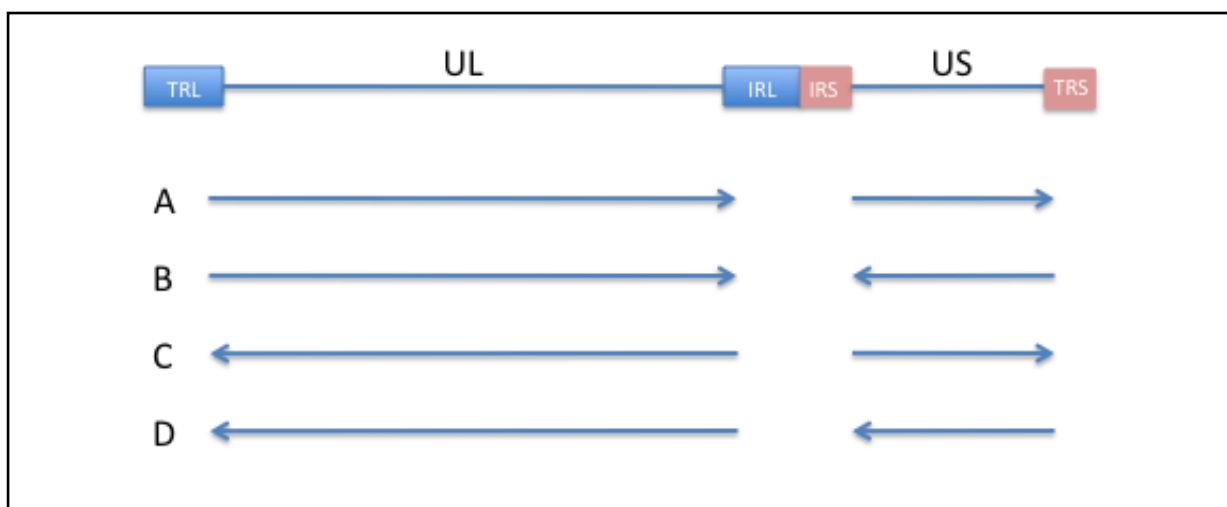
Des travaux plus récents utilisant l'analyse en spectrométrie de masse des protéines incluses dans les virions tendent à montrer que ces protéines font partie intégrante du virion et ne sont pas des contaminations cellulaires des préparations virales étudiées (Varnum et al., 2004)

- Présence d'ARN

On retrouve dans le virion deux catégories d'ARN :

- Deux ARN qui s'hybrident avec l'origine de réplication *oriLyt* et permettent, avec UL84, l'initiation de la réplication (Colletti et al., 2007 ; Prichard et al., 1998)
- Des ARNm ont aussi été identifiés dans le tégument du virion (Bresnahan et Shenk, 2000) : transcrits très précoce (UL106-109), précoce (TRL/IRL2-5 et TRL/IRL7) et tardif (UL21.5). Ces ARNm sont accumulés au stade tardif de l'infection quand les virions sont assemblés. Libérés dans le cytoplasme de la cellule infectée, ils sont traduits avant que le génome viral ne soit transcrit mais leur fonction reste pour le moment inconnue (Roizman, 2000).

### c. Le génome



**Figure 3 : Représentation schématique du génome du CMVH** (Hantz, 2009).

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.

Le CMVH possède le génome le plus long et le plus complexe de tous les *Herpesviridae* avec un ADN linéaire bicaténaire de 229 à 354 kpb 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<sub>L</sub> correspondant à 82 % du génome avec 132 cadres ouverts de lecture (U<sub>L</sub>1 à U<sub>L</sub>132), et d'autre part, un segment unique court, U<sub>S</sub> comportant 34 cadres ouverts de lecture (U<sub>S</sub>1 à U<sub>S</sub>34). 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<sub>L</sub> et U<sub>S</sub>. Cette organisation permet au génome d'adopter quatre formes isomériques, présentes en quantité équimolaires, selon l'orientation des parties de la molécule (Figure 3).

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 (McVoy et Adler, 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, un seul isolat clinique, la souche Merlin, a été intégralement séquencée (Dolan et al., 2004). Par convention, les cadres de lecture ouverts sont numérotés à partir de l'extrémité 5' des segments génomiques TR<sub>L</sub> (IR<sub>L</sub>), U<sub>L</sub>, U<sub>S</sub>, TR<sub>S</sub> (IR<sub>S</sub>) 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'emballage 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  $\alpha$

Ces gènes codent les protéines impliquées dans la régulation du cycle cellulaire. Ils 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 (UL82).

- Les gènes précoces ou *Early*, E, ou gènes  $\beta$

Ces gènes 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 UL54, la protéine accessoire de la polymérase UL44, la phosphoprotéine UL97, les trois sous-unités du complexe primase/hélicase, UL70, UL102 et UL105 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  $\gamma$

Ces gènes codent les protéines de capsid, les protéines de l'enveloppe et les protéines du tégument qui sont les protéines de structure du virion précédemment citées.

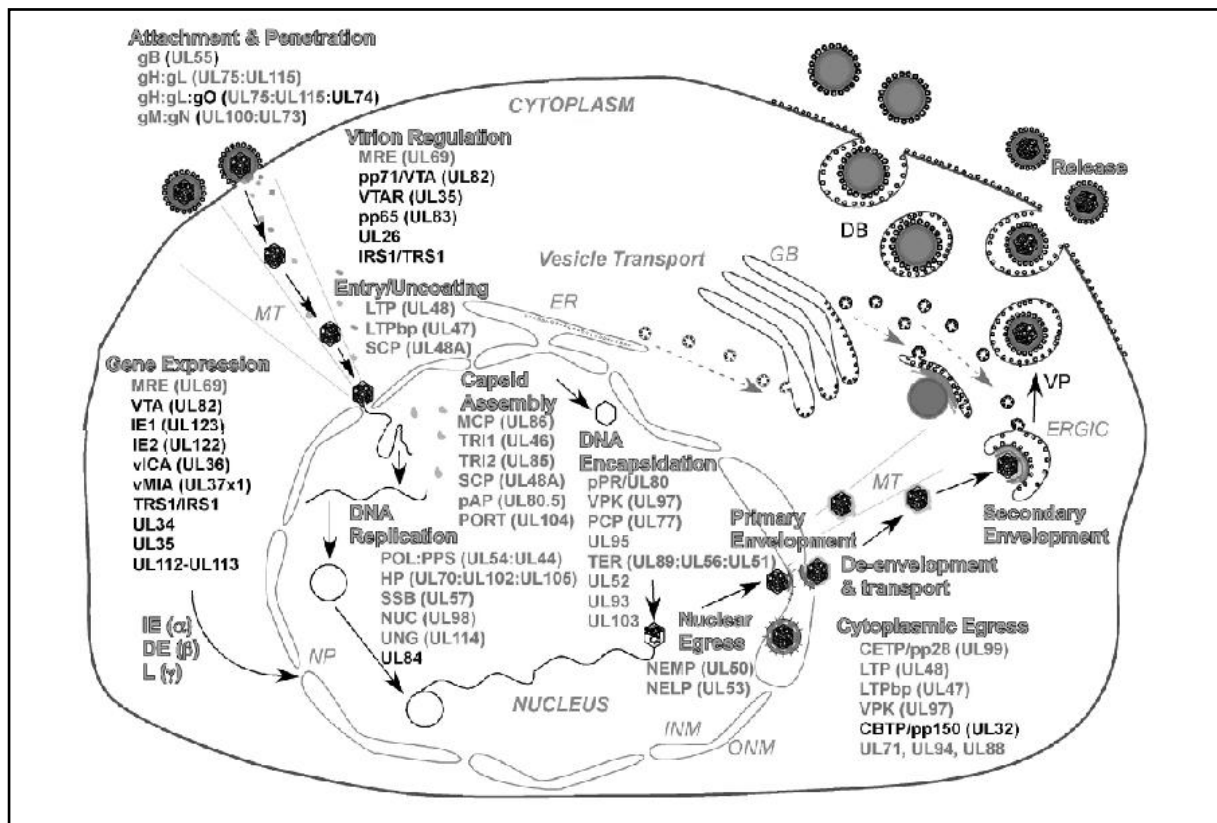
#### d. Cycle répliatif du CMVH (Figure 4)

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. La durée du cycle de réplication, étudié dans les fibroblastes, est de 96 à 120 heures.

- Attachement et pénétration du virus

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). Après la fusion non spécifique du virus au niveau des éléments de la matrice extracellulaire, les glycoprotéines d'enveloppe, interviennent dans la liaison du virus à ses récepteurs sur la membrane de la cellule hôte (PLC $\gamma$ , MAPK, NF $\kappa$ B, Sp1 et AP1). La fixation de gB et gH provoque un réarrangement de la membrane phospholipidique aboutissant au rapprochement des récepteurs EGFR et des intégrines. Ce phénomène aboutit à la pénétration du virus par fusion des membranes et les glycoprotéines d'enveloppe interviennent aussi dans cette étape en particulier gB, gH et gL (Compton, 2004). Cependant, un autre mode de pénétration a été décrit pour les cellules endothéliales et épithéliales, cette pénétration se faisant par endocytose et faisant intervenir spécifiquement les glycoprotéines gH et gL ainsi que les protéines UL128, UL130 et UL131A (Adler et Sinzger, 2009). La fixation des glycoprotéines d'enveloppe sur leur récepteur respectif permet une activation 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 qui prendront en charge le transit du virion vers le noyau.





**Figure 4 : Le cycle de réplication du CMVH (Mocarski et al., 2007)**

Le schéma montre la réplication du CMVH telle qu'elle se produit dans les fibroblastes humains et met en évidence les gènes conservés chez les herpesvirus qui jouent un rôle connu ou prédit dans les étapes de la réplication virale. Les étapes principales sont indiquées en caractère gras et les flèches indiquent le cheminement entre les étapes. L'entrée du virus se produit après l'attachement à la surface de la cellule et la pénétration se produit suite à une fusion entre la membrane cellulaire et l'enveloppe du virion. Le processus d'entrée requiert les glycoprotéines gB ; gH-gL et probablement gO et gM-gN. L'attachement du virion conduit à une stimulation similaire à la voie de signalisation induite par les interférons. Les protéines du tégument qui sont impliquées dans la régulation du cycle cellulaire sont relarguées dans le cytoplasme. Parmi ces protéines UL47 et UL48 jouent un rôle plus que probable dans le transport par les microtubules et l'encrage au niveau du pore nucléaire de la nucléocapside et dans la décapsidation et l'entrée de l'ADN viral dans le noyau. La régulation transcriptionnelle des gènes viraux et cellulaires se fait par l'intermédiaire des gènes très précoces (IE1 ; IE2) ou des gènes précoces (UL34, UL35, UL112-UL113). La mort cellulaire est réprimée par vICA et cMIA (codés par des gènes très précoces). La réplication de l'ADN viral dépend de plusieurs protéines notamment de l'ADN polymérase virale UL54 et de sa protéine accessoire UL44. De nombreuses protéines interviennent dans l'assemblage de la capsid et l'encapsidation de l'ADN viral néo synthétisé. Entre autre, on retrouve dans ces protéines les terminases codées par *UL56*, *UL89* et la protéine portail codée par *UL104*. La sortie du noyau se fait sous contrôle d'UL50 et UL53. Le transport dans le cytoplasme est pris en charge par les microtubules pour permettre l'enveloppement de la nucléocapside et la maturation du virion dans les compartiments cellulaires et son enveloppement au niveau de l'appareil de Golgi avant son excréation.

MT : microtubules ; IE : *immediate early* ou très précoce ; DE : *delayed early* ou précoce ; NP : *nuclear pore* ou pore nucléaire ; ER : *endoplasmic reticulum* ou réticulum endoplasmique ; GB : *Golgi body* ou appareil de Golgi ; INM : *inner nuclear membrane* ou membrane nucléaire interne ; ONM : *outer nuclear membrane* ou membrane nucléaire externe ; ERGIC : *endoplasmic reticulum Golgi intermediate compartment* ou compartiment intermédiaire entre réticulum endoplasmique et Golgi ; VP : *virus particle* ou particule virale ; DB : *dense body* ou corps dense.

- Evènements très précoces

Les gènes viraux sont exprimés en cascade et les premiers gènes transcrits sont dits très précoces (*Immediate Early*, IE). Cette phase débute en l'absence de synthèse *de novo* de protéines virales et 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.

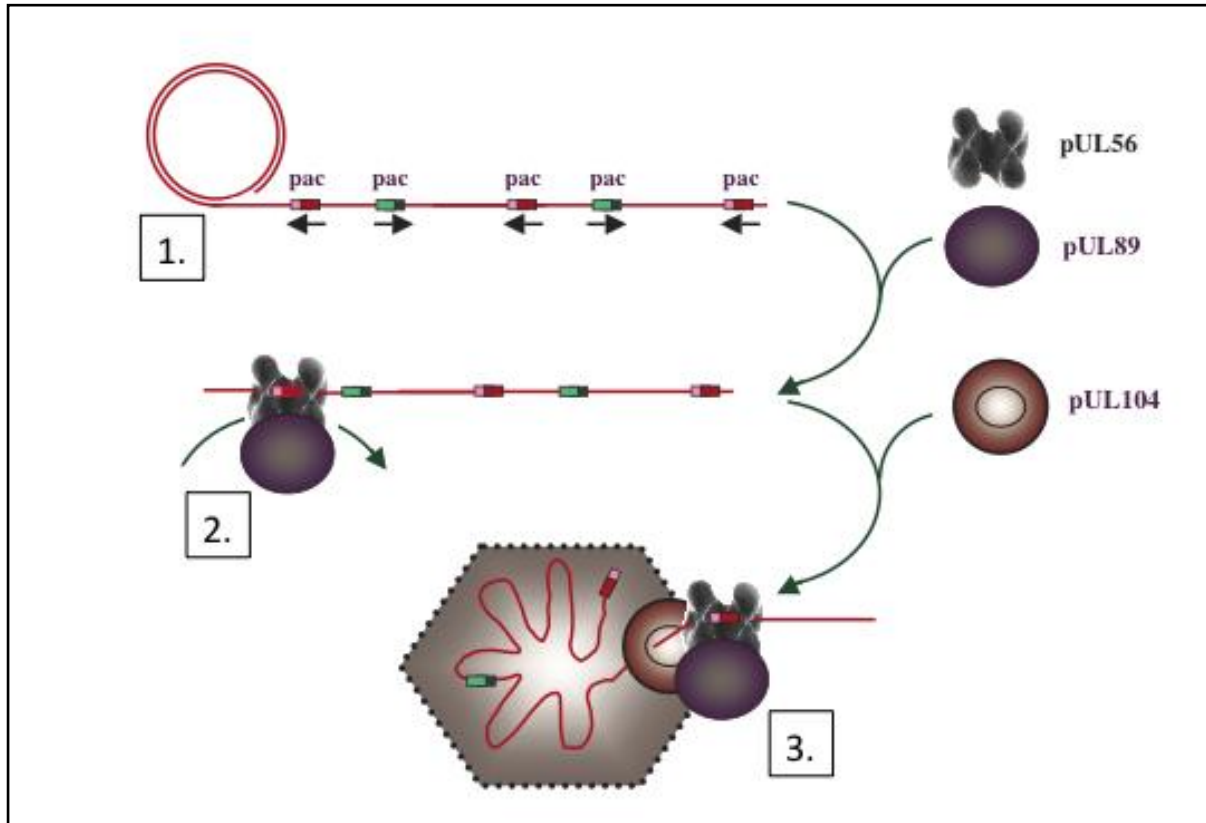
- Evènements précoces

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 (Figure 5). L'initiation de la réplication de l'ADN viral est effectuée par UL84 qui permet le déroulement de l'ADN par les trois sous unités du complexe primase/hélicase, UL70, UL102 et UL105 au niveau de l'origine de réplication oriLyt situé sur le segment UL du génome. La phosphoprotéine de liaison à l'ADN simple brin UL57 permet quant à elle d'éviter la réhybridation des brins d'ADN. Ensuite, la polymérase virale UL54 et sa protéine accessoire, UL44 initient la synthèse de l'ADN viral. L'ADN viral est synthétisé sous forme de concatémères qui sont de longues molécules d'ADN constituées d'une succession d'unités de génome, séparées par des séquences pac.

- Evènements tardifs

La phase tardive (*Late*, L), pendant laquelle sont transcrits 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. C'est pendant cette phase qu'ont lieu la maturation de l'ADN viral, son encapsidation dans les capsides néoformées et la tégmentation des virions ainsi que leur excréation.



**Figure 5 : Réplication et encapsidation de l'ADN viral néosynthétisé (d'après Champier, 2006)**

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 UL56 permet le premier clivage de l'ADN et la fixation du complexe UL56/ADN à UL89. 3. Encapsidation de l'ADN viral. Le complexe UL56/UL89 se fixe à la protéine portail de la capsid UL104 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.

Les concatémères formés lors de la réplication de l'ADN viral sont clivés et empaquetés dans les capsides. L'assemblage se fait dans le noyau vers la 48ème heure après le début de l'infection. 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. L'ensemble de ce processus, nommé encapsidation 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 : UL51, UL52, UL56, UL77, UL89 et UL104 sont les homologues des protéines UL32, UL33, UL28, UL25, UL15 et UL6 de HSV-1 (Bogner et al., 1998). Différentes études ont montré la conservation des terminases chez les herpèsvirus et les bactériophages (Chee et al., 1990) (Beard, 2002).

Les capsides préformées sont transportées au niveau des compartiments de réplication de l'ADN par les protéines UL52 et UL93 qui pourraient être liées à ces capsides et jouer ainsi un rôle important dès le début de l'encapsidation. La machinerie d'encapsidation est formée d'un complexe hétérodimérique terminase comprenant une sous-unité ATPase (UL89) et d'une sous-unité de reconnaissance de la capside et de l'ADN (UL56) (Scheffezik et al., 2002). Cette machinerie s'associe à une protéine pentamérique UL104. De par sa structure cette protéine forme 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 UL56 reconnaît les séquences *pac*, se fixe à leur niveau ce qui active le premier clivage de l'ADN et la fixation du complexe UL56/ADN à UL89. Puis le complexe UL56/UL89/ADN ainsi formé se fixe à la protéine portail UL104 permettant le transfert de l'ADN dans la capside. Le complexe UL56/UL89, réalise alors le second clivage de l'ADN qui est libéré dans la capside puis le complexe se dissocie pour permettre une nouvelle encapsidation. Ce mode d'encapsidation aboutit à la libération de trois types de particules : les virions complets, les corps denses (structures enveloppées de 400 à 600 nm de diamètre formées d'agrégats de protéines du tégment) et les particules non infectieuses (capsides enveloppées contenant un génome tronqué ou dépourvues de génome).

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 UL28, pp65, UL71 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 capside pour constituer le tégment. L'enveloppe définitive est acquise quand la particule bourgeoonne dans la lumière d'un compartiment dérivé du système sécrétoire cellulaire.

## II. L'infection à CMVH

### 1. Epidémiologie du CMV

Les études qui rassemblent les données de surveillance sérologique à travers le monde démontrent que le CMVH est un virus ubiquitaire humain, que les infections sont endémiques et évoluent sans influence saisonnière et qu'il infecte une large proportion de la population et ce dès le plus jeune âge. La séroprévalence dépend de la population étudiée et peut atteindre 40% à 100% des individus dans un pays ou une région donnée et ces valeurs varient en fonction des conditions socioéconomiques. L'infection pendant l'enfance est particulièrement importante dans les pays en voie de développement alors que dans beaucoup de pays développés plus de 50% de la population demeure séronégative à l'âge adulte. Dans l'Europe de l'ouest et en France en particulier cette séroprévalence est proche des 50% à 50 ans (Imbert-Marcille, 2002) et de 42% chez les femmes en âge de procréer (Gouarin et al., 2002).

La séroprévalence suit une distribution bimodale avec un premier pic pendant la petite enfance et un second chez le jeune adulte. Le premier résulte d'une part de la transmission verticale du virus, l'infection à CMVH restant actuellement la première cause d'infection congénitale d'origine virale dans le monde avec 0,3 à 1,2% des nouveau-nés vivants (Pass, 2005). Il résulte aussi 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 et en Europe environ 25% des enfants de 2 ans sont déjà infectés (Kuijpers et al., 2003). Le second pic varie selon la situation géographique et est probablement dû à une transmission sexuelle et dans le monde, entre 14 et 18 ans, environ 60% des jeunes adultes sont ainsi contaminés (Kuijpers et al., 2003).

Pour ce qui est de l'infection congénitale, le taux de transmission est proche 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 neurosensorielles 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. Cependant la prévalence demeure élevée 90% dans cette population du fait des modes de transmission communs.

En transplantation d'organes solides, le CMV peut être responsable :

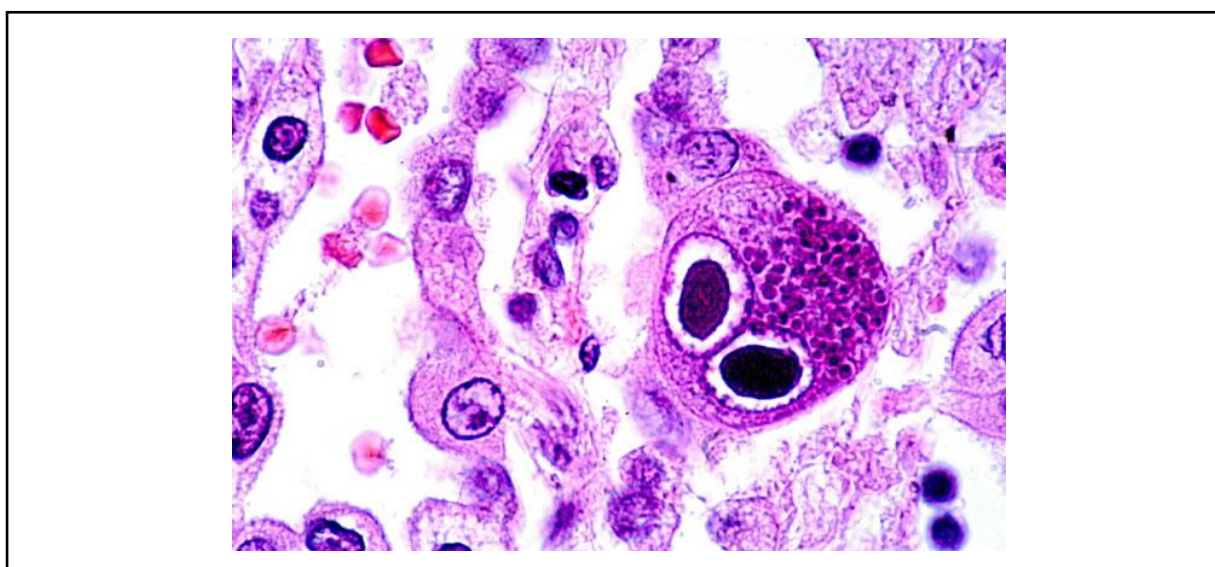
- d'une primo-infection chez les patients séronégatifs recevant un rein provenant d'un donneur séropositifs (D+R-)
- d'une réactivation chez les patients séropositifs (R+)
- d'une surinfection chez les patients séropositifs recevant un rein provenant d'un donneur séropositifs (D+R+).

Dans le contexte de la transplantation d'organes, le virus est associé à une morbidité significative et parfois à une plus grande mortalité. En l'absence de traitement préventif, l'infection à CMV survient chez 60 à 80 % des patients transplantés D+R- pour le CMV recevant un organe solide (Fishman et Rubin, 1998). Son incidence baisse sous traitement préventif à 50 % environ (Paya et al., 2004), (Kliem et al., 2008), (Khoury et al., 2006) et si ce traitement est prolongé pendant 6 mois l'incidence de l'infection à CMV chute encore à 37% (Humar et al., 2011). Chez les patients D+R+, l'infection à CMV survient chez 50 à 60 % des patients transplantés. L'impact du traitement préventif est aussi important en faisant baisser le taux d'infection entre 10 et 20%. Chez les D-R+, les choses sont moins claires car le taux de réactivation se situe dans une fourchette large entre 25 et 75% et diminue sous traitement préventif entre 0 et 27 % (Khoury et al., 2006), (Kliem et al., 2008). Globalement les infections surviennent dans les trois premiers mois avec la stratégie préemptive, et après le troisième mois avec la stratégie préventive. En effet, seulement 3 à 9% des patients développent une virémie sous traitement préventif (Reischig et al., 2008), (Paya et al., 2004).

Le taux de maladie à CMV dans la population à risque est faible quelle que soit la stratégie antivirale utilisée. Sans traitement à la fin des années 90, il était de 50% dans le sous-groupe de patients D+R- (Lowance et al., 1999), et de 20% chez les R+ (Sagedal et al., 2000). Le sous-groupe des D+R- est donc celui qui a bénéficié le plus de l'utilisation d'antiviraux en prophylaxie (Lowance et al., 1999). Avec un traitement préventif de 3 mois, le risque de maladie à CMV est d'environ 30% au cours de la première année (Paya et al., 2004). Ces maladies à CMV surviennent toutes après 3 mois (Sun et al., 2008). 70% de ces maladies tardives surviennent entre 3 et 6 mois et 25% entre 6 mois et 1 an (Humar et al., 2005). Pour diminuer leurs incidences, un traitement préventif pendant 6 mois est maintenant proposé. Avec cette stratégie prolongée, le taux de maladie à CMV observée au cours des 12 premiers mois post transplantation diminue encore à 15% (Humar et al., 2010).

## 2. Physiopathologie

Le CMV est un virus lytique qui cause un effet cytopathique *in vitro* et *in vivo*. La manifestation caractéristique de l'infection par le CMV correspond à une ballonnisation des cellules avec l'apparition dans le cytoplasme de corps d'inclusion. Cette cytomégalie est aussi retrouvée avec les autres *Betaherpesvirinae*. En microscopie on parle classiquement d'aspect en « œil de hibou » (Figure 6) même si dans les coupes de tissus d'organes infectés cet aspect est minoritairement observé ou même totalement absent.



**Figure 6** : Aspect caractéristique en « œil de hibou » de cellules infectées par le CMV (photo de Danny L. Wiedbrauk)  
Photographie en microscopie optique 480x d'une coupe de tissu pulmonaire colorée à l'hématoxyline-éosine.

### a. Immunologie

Lors de la primo-infection la première barrière est l'immunité non spécifique. Celle-ci associe l'activité phagocytaire des macrophages, l'activité antivirale des interférons alpha et bêta (IFN  $\alpha$  et IFN  $\beta$ ) et l'activité cytotoxique des cellules NK (Mazeron et al., 2009).

Intervient ensuite la réponse humorale spécifique. Chez les patients, des IgM spécifiques du CMV peuvent être détectés dès 4 à 7 semaines après l'infection et ces anticorps persistent ensuite pendant 16 à 20 semaines. Cette réponse humorale est dirigée contre un nombre restreint de protéines virales. Les plus immunogènes sont des protéines du tégument UL32 (pp150), UL83 (pp65) et UL99 (pp28). 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. La plupart des anticorps neutralisants sont dirigés contre la gB, une glycoprotéine d'enveloppe du virus, et des études montrent que plus de 50% de l'activité neutralisante est circonscrite à cette glycoprotéine. Il faut toutefois garder à l'esprit que le rôle de la réponse humorale dans la protection contre l'infection à CMV est secondaire et que la présence d'anticorps neutralisants à titre élevé n'empêche pas les réinfections ou les réactivations (Arora et al., 2010).

La réponse immunitaire à médiation cellulaire est quant à elle considérée comme le facteur principal dans le contrôle de l'infection à CMV et les patients déficients sont les plus exposés aux complications liées à cette infection. Les lymphocytes CD4<sup>+</sup> et CD8<sup>+</sup> jouent un rôle important dans la protection immunitaire après une primo infection ou une réactivation après latence. Les CD4<sup>+</sup> 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 UL83 notamment. Le lymphocyte CD4<sup>+</sup> activé produit des cytokines qui activent la réponse cytotoxique CD8<sup>+</sup> 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. Les études menées sur les receveurs de moelle osseuse ont révélé que les patients qui ne développent pas de cellules CD4<sup>+</sup> et CD8<sup>+</sup> spécifiques du CMV sont exposés à un risque accru de pneumopathies, et qu'aucun cas de pneumonie à CMV n'a jamais été rapporté pour les receveurs de greffe allogénique de moelle osseuse recevant des clones de cellules T CD8<sup>+</sup> spécifiques de CMV dérivées du donneur, reconstituant ainsi l'immunité cellulaire et le contrôle la réplication virale (Walter et al., 1995).

Il existe avec le CMV 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  $\beta$ 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 CMV induit une diminution de la réponse lymphocytaire proliférative aux mitogènes et aux antigènes bactériens et viraux (y

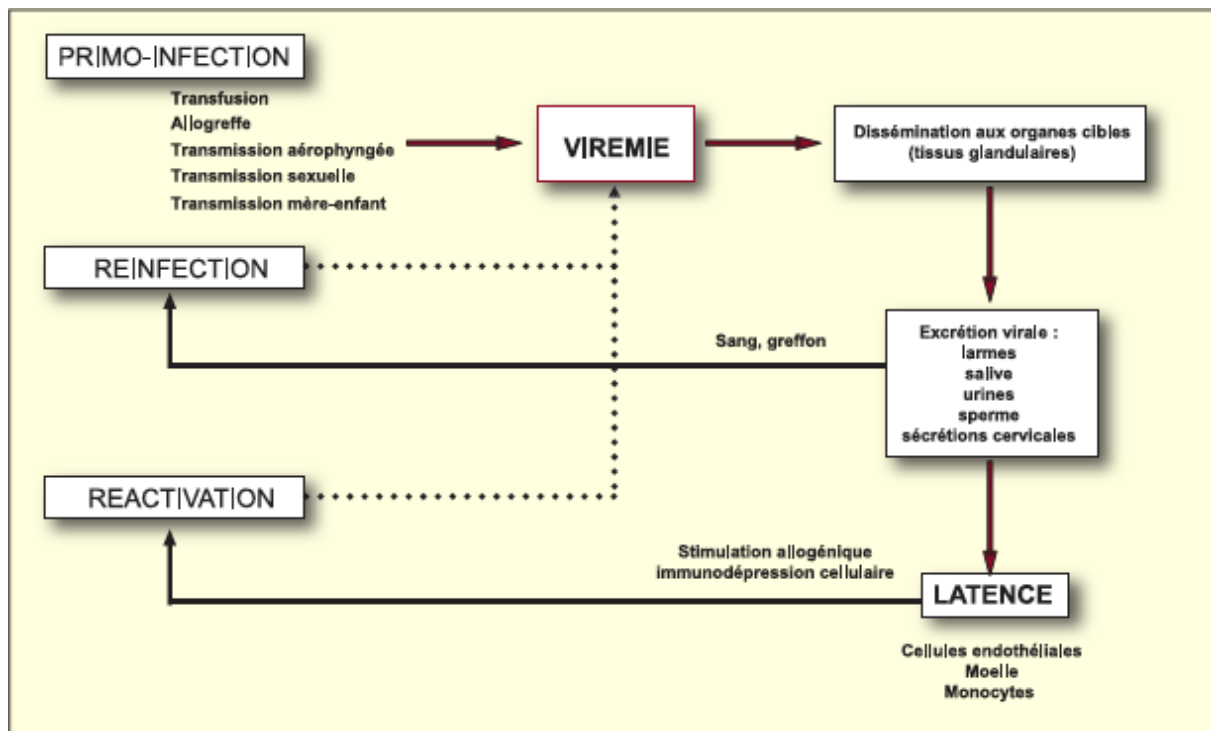


compris les antigènes du CMVH), une inversion du rapport des lymphocytes T CD4+/CD8+ du fait d'une augmentation du nombre de lymphocytes CD8+. La réponse CD8+ cytotoxique est diminuée. L'expression des molécules de classe I et II du complexe majeur d'histocompatibilité est inhibée par l'infection à CMVH. 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  $\gamma$  de la synthèse des molécules de classe II. De plus l'IFN $\alpha$ , produit par les cellules infectées, inhibe l'induction de l'expression des molécules de classe II par l'IFN  $\gamma$  (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 $\beta$  et TNF $\alpha$ ), 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).

#### b. Primo infection et virémie

Le CMVH peut infecter un grand nombre de types cellulaires (cellules endothéliales, épithéliales, fibroblastiques, dendritiques, macrophagiques, cellules nerveuses, cellules musculaires lisses et hépatocytes). Cette particularité fait du CMVH un virus capable d'infecter de nombreux tissus et ainsi être mis en évidence dans la plupart des organes. Pendant 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 7) et les fibroblastes sont une cible majeure de l'infection, permettant sa propagation dans de nombreux organes tels que le placenta, le poumon, l'intestin.



**Figure 7 : Physiopathologie de l'infection à CMVH (Alain et al., 2008).**

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. 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. Les cellules endothéliales sont aussi impliquées dans la dissémination sanguine du virus. 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, 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- $\alpha$ , notamment). Ces polynucléaires acquièrent par contact direct des particules virales et la protéine UL83 (pp65) qui se localise dans le noyau du fait de son ciblage nucléaire. Ces cellules, qui ne sont pas siège de répllication 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.

#### c. Latence et réactivation (Soderberg-Naucler et al., 1999)

Le cytomégalovirus persiste à l'état latent comme tous les autres herpesvirus. 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- $\alpha$  et l'interféron- $\gamma$ , 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).

#### d. Manifestations cliniques

Les manifestations cliniques de l'infection à CMVH varient selon l'état immunitaire du patient infecté et si cette infection est le plus souvent asymptomatique chez

l'immunocompétent, elle peut avoir des conséquences graves chez l'immunodéprimé ou dans le cadre d'infections materno-fœtales.

- L'infection congénitale à CMV

L'infection congénitale à CMV est connue comme étant une des TORCH (*toxoplasmosis, other infections including syphilis, rubella, CMV, and HSV* ou toxoplasmose et autres infections comprenant la syphilis, la rubéole, le CMV et l'HSV) qui sont connues pour être responsable de désordres symptomatiques significatifs et de retards de développement chez les nouveaux nés. Le syndrome clinique de la maladie congénitale des inclusions cytomégaliennes incluant ictère, splénomégalie, thrombocytopénie, retard de croissance intra-utérine, microcéphalie et rétinites.

Les symptômes les plus fréquemment retrouvés au cours des infections congénitales à CMV sont : la pétéchie (71%), ictère (67%), microcéphalie (53%) et retard de croissance (50%). Les anomalies rapportées en laboratoire comprennent l'hyperbilirubinémie (81%), une augmentation de la concentration des enzymes hépatocellulaires (83%), une thrombocytopénie (77%) et une augmentation de la concentration des protéines du LCR (77%). Les études montrent que les enfants sans symptômes apparents mais présentant des atteintes neurologiques étaient plus enclins à avoir des anticorps (IgM) spécifiques du CMV. De nombreux cas de surdité chez l'enfant peuvent aussi résulter d'une infection congénitale à CMV et l'excrétion virale effective est fréquente chez l'enfant ce qui signifie qu'il représente un réservoir pour l'infection d'autres enfants ou pour les personnes en contact avec les enfants.

Le statut immunitaire de la femme vis-à-vis du CMV est important dans l'évaluation du risque d'infection transplacentaire et le cas échéant des atteintes potentielles du fœtus et de l'enfant. Les atteintes symptomatiques d'infections à CMV sont beaucoup moins fréquentes chez les femmes déjà séropositives pour ce virus et un cas sur dix d'infection grave à CMV pendant la grossesse se traduit en maladie à CMV congénitale.

- Pneumopathies à CMV

Les pneumopathies à CMV sont définies comme étant liées aux signes et symptômes d'atteinte pulmonaire associés à une détection de CMV dans les fluides bronchoalvéolaires ou dans le tissu pulmonaire (Ljungman et al., 2002). La détection du virus devant résulter d'une culture virale, d'une analyse histopathologique, immunohistochimique ou d'une hybridation *in situ* car la détection par PCR est trop sensible pour révéler cette pathologie pulmonaire.

Parmi les adultes présentant une infection à CMV, entre 0% et 6% développe une pneumopathie et une étude a montré que l'incidence de ces pneumopathies à CMV chez les patients immunocompétents était de 19%. Dans la plupart des cas les pneumopathies à CMV sont visibles par radiographie de la cage thoracique et dans la plupart des cas elle disparaît rapidement en même temps que la primo infection sans séquelles. En revanche chez le sujet immunodéficient, des formes sévères peuvent apparaître et c'est chez les transplantés pulmonaires que l'on recense les prévalences les plus élevées de pneumopathies à CMV et c'est aussi chez ces transplantés que l'on retrouve les formes les plus sévères.

- Hépatites à CMV

Les hépatites à CMV se caractérisent par un taux élevé de bilirubine et/ou des enzymes hépatiques en combinaison avec la détection de CMV en l'absence d'autres causes d'hépatite. Dans ces cas la mise en évidence du CMV peut se faire par culture, histopathologie, immunohistochimie ou hybridation *in situ* (Ljungman et al., 2002). La PCR seule étant insuffisante pour le diagnostic, un résultat positif pouvant traduire une excrétion virale transitoire. Le premier cas d'hépatite à CMV décrit impliquait un enfant présentant une chorioretinite, une hépato-splénomégalie et une calcification cérébrale.

Les hépatites sont couramment retrouvées chez les patients avec une primo infection à CMV et une mononucléose. Le niveau des enzymes hépatiques peut être augmenté modérément transitoirement dans certains cas et rarement on peut observer une jaunisse. Le pronostic est favorable chez le patient immunocompétent mais peut s'avérer fatal chez l'immunodéprimé. L'étude histologique de ces hépatites révèle typiquement une infiltration cellulaire mononucléaire de l'espace porte et peut aussi parfois se traduire par une inflammation granulomateuse (Bonkowsky et al., 1975).

- Gastrites et colites à CMV

Les désordres gastro-intestinaux liés à l'infection à CMV sont définis par la combinaison de symptômes au niveau du tractus gastro-intestinal, de lésions des muqueuses visibles par endoscopie et par la détection de CMV via culture virale, histopathologie, immunohistochimie ou hybridation *in situ*. La colite à CMV a été décrite pour la première fois en 1985 chez deux patients masculins homosexuels qui présentaient des douleurs abdominales, des diarrhées et des rectorragies (Meiselman et al., 1985). Comme pour les pneumopathies et les hépatites, la PCR seule n'est pas suffisante pour un diagnostic fiable.

Le CMV peut infecter n'importe quelle partie du tractus gastro-intestinal, depuis la cavité buccale jusqu'au colon et la manifestation clinique typique consiste en des lésions ulcéreuses. Au niveau de la cavité buccale ces lésions sont similaires à celles causées par le HSV ou des ulcérations aphteuses. Les gastrites peuvent provoquer des douleurs abdominales et même des rectorragies alors que les colites se manifestent le plus souvent par des diarrhées. Les désordres gastro-intestinaux liés à l'infection à CMV ne durent en général pas longtemps en comparaison des atteintes au niveau des autres organes grâce au renouvellement rapide des cellules de la muqueuse gastro-intestinale.

- Atteintes du système nerveux central

Les atteintes du système nerveux central (SNC) par le CMV sont définies par des symptômes au niveau de ce SNC en association à la détection de CMV dans le liquide céphalorachidien (par culture virale ou PCR) ou dans le tissu cérébral (par culture virale, histopathologie, immunohistochimie, hybridation *in situ*). En France, l'association du CMV et du syndrome de Guillain-Barré concerne deux groupes. Les patients jeunes (âgés de moins de 35 ans) qui présentent un défaut sensoriel et une paralysie faciale, une réponse de type IgM aux antigangliosides, et des séquelles modérées à long terme. Le second groupe concerne les femmes de plus de 50 ans (Orlikowski et al., 2011). Compte tenu de la variabilité de l'âge de la primo-infection en fonction des pays, ces observations ne sont pas applicables dans les autres pays.

- Rétinites à CMV

Les rétinites à CMV sont parmi les infections opportunistes les plus communément retrouvées chez les patients atteints du SIDA et particulièrement ceux pour qui le nombre de lymphocytes CD4+ est en dessous de 50 cellules par  $\mu\text{L}$ . Bien que le nombre de cas ait diminué avec l'utilisation des trithérapies antirétrovirales de nouveaux cas continuent d'être décrits. Les personnes atteintes de rétinite à CMV montrent une perte progressive de l'acuité visuelle qui peut conduire à une cécité en l'absence de traitement. Il existe des troubles unilatéraux et bilatéraux et de traitements sur de longues périodes sont nécessaires afin de prévenir une rechute et toute suspicion de rétinite à CMV doit être confirmée par un ophtalmologiste.

Après les traitements antirétroviraux combinés, le syndrome inflammatoire de la restauration immunitaire est constaté dans 16% à 63% des cas de patients co-infectés par le VIH et le CMV et présentant une rétinite à CMV (Jabs et al., 2002 ; Wohl et al., 2005). Dans

une étude le temps moyen constaté de l'apparition de ce syndrome après le début du traitement est de 43 semaines mais peut varier de 4 semaines à 4 ans en fonction des cas (Wright et al., 2003 ; Karavellas et al., 1999). Ce syndrome peut se manifester sous plusieurs formes comme une vision voilée, une diminution de l'acuité visuelle ou des douleurs oculaires. Des patients développent des œdèmes maculaire menant à une perte de la vision ou à une vitréorétinopathie proliférative, une hémorragie spontanée de la vitrée et un décollement de la rétine.

- Néphrite à CMV

La néphrite à CMV est définie par la détection de CMV en combinaison avec une biopsie rénale montrant des caractères particuliers de l'infection à CMV dans le cadre d'une insuffisance rénale. La PCR CMV, de même que la détection de CMV dans les urines d'un patient présentant une insuffisance rénale ne sont pas des critères suffisant pour diagnostiquer une néphrite à CMV (Ljungman et al., 2002). Enfin dans le cadre de l'infection à CMV, une virémie peut être associée à une blessure glomérulaire aigue (Richardson et al., 1981).

- La maladie à CMV

Même si il vaut mieux en général ne pas parler de syndrome CMV chez les receveurs de cellules souches hématopoïétiques car d'autres virus comme HHV-6 peuvent aussi provoquer fièvres et atteintes de la moelle osseuse, il s'agit chez le receveur d'organe, d'une fièvre supérieure à 38°C pendant au moins deux jours dans une période de quatre jours consécutifs, de la détection de CMV dans le sang et d'une neutropénie ou d'une thrombocytopenie (Ljungman et al., 2002).

e. Greffes et infection à CMV

Les traitements immunosuppresseurs favorisent 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.

- 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 HHV-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).

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).

- 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 100ème 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).

### **3. Prise en charge thérapeutique**

#### **a. Molécules antivirales (Figure 8)**

Il existe un nombre limité de molécules thérapeutiques approuvées pour l'utilisation en pratique clinique contre les infections à CMVH. Ces molécules possèdent, en outre, une activité modérée et une toxicité non négligeable qui limite grandement leur utilisation. Trois composés ciblent l'ADN polymérase du CMVH en inhibant la synthèse de l'ADN viral : le ganciclovir, le cidofovir et le foscarnet. L'aciclovir et sa pro-drogue le valaciclovir peuvent être utilisés mais uniquement en prophylaxie. Enfin, il existe aussi un oligonucléotide anti sens, complémentaire de l'ARNm qui code la protéine IE-2, le fomivirsen. Ce composé est utilisé dans le traitement des rétinites à CMV chez les patients infectés par le VIH dans l'incapacité de recevoir d'autres traitements (De Smet et al., 1999).

- Ganciclovir (GCV) et valganciclovir (VGCV)

L'utilisation du GCV ou 9-(1,3-dihydroxy-2-propoxyméthyl)-guanine, est fréquente et se pratique depuis le début des années 1980. Cette molécule fut la première à être homologuée dans le traitement des infections à CMVH et reste à ce jour la plus couramment utilisée. Elle donne de bons résultats chez les patients transplantés, immunodéprimés à la suite des traitements antirejet (Jacobson, 1994), cependant, l'apparition de résistances à ce médicament est assez fréquente au sein de cette population et semble résulter du faible niveau de réplication virale qui persiste malgré la thérapie (Emery et Griffiths, 2000 ; Griffiths, 2001). Pour être actif, le GCV doit subir trois phosphorylations, la première est réalisée par la phosphotransférase virale UL97 (Sullivan et al., 1992) et les deux autres par des kinases cellulaires (Fauld et Heel, 1990). Le GCV agit au niveau du site catalytique de l'ADN polymérase virale, par compétition avec les nucléosides substrats naturels de cette enzyme et bloque ainsi l'élongation de la molécule d'ADN en synthèse. *in vitro* la concentration inhibitrice 50% (CI<sub>50</sub>) sur les souches sensibles est comprise entre 2,5 µM et 8 µM.

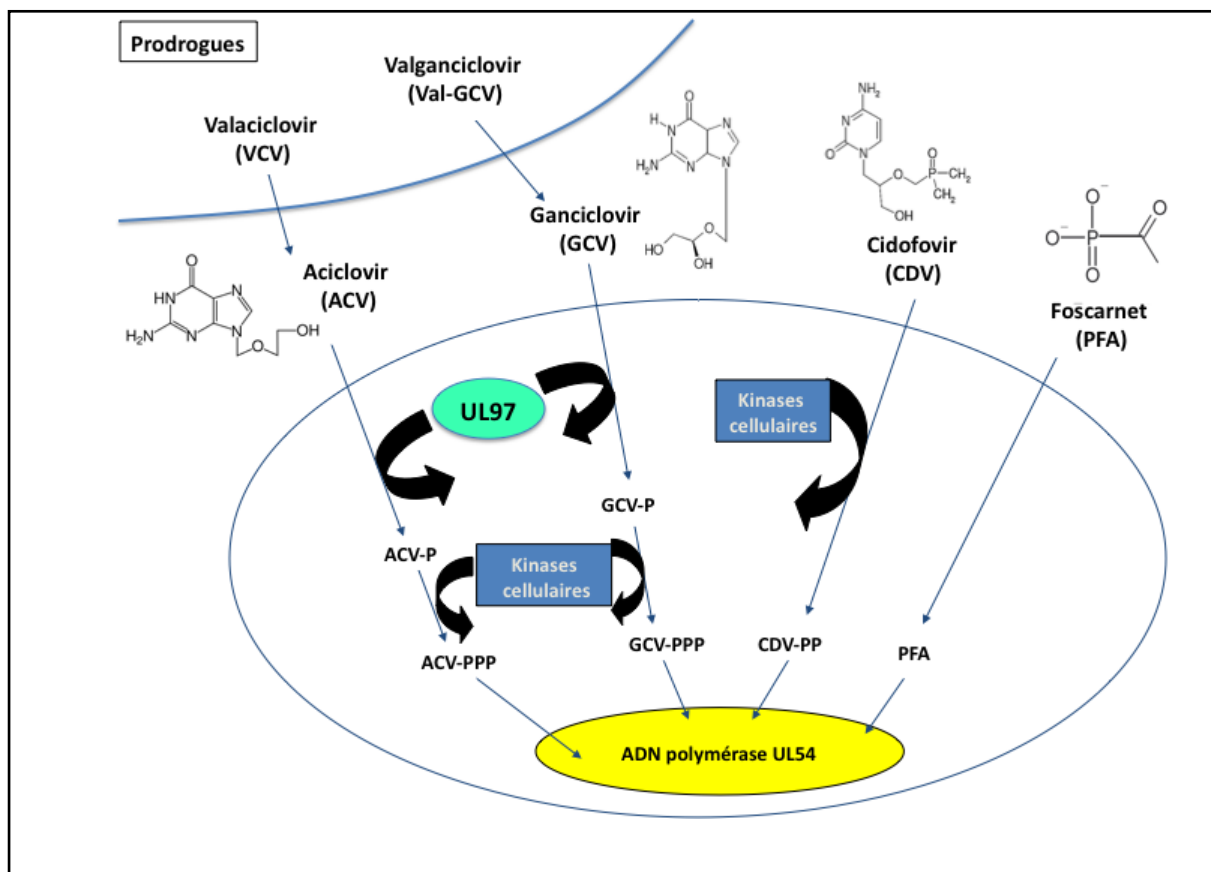
Une pro-drogue du GCV, le valganciclovir (VGCV) est aussi couramment utilisée. Il possède une biodisponibilité dix fois supérieure à celle du GCV qui n'excède pas 10%. Ce composé est métabolisé en GCV au niveau du foie et de la paroi intestinale.

Ces deux composés sont éliminés par voie rénale et leur principal effet indésirable est leur toxicité hématologique, neurologique et rénale.

- Cidofovir (CDV)

Le CDV ou 1-(3-hydroxy-2-phosphonylméthoxypropyl)-cytosine est un analogue de la désoxycytidine monophosphate. Cet antiviral actif sur un large panel de virus à ADN (De Clercq et Holy, 2005) est aussi un inhibiteur compétitif de l'ADN polymérase virale du CMVH qui nécessite d'être phosphorylé deux fois par des kinases cellulaires pour être actif (Cihlar et Chen, 1996). Les CI<sub>50</sub> obtenues *in vitro* avec ce puissant composé sont plus faible que celles obtenues avec le GCV, de 0,5 µM à 1 µM sur les souches sensibles.

L'effet indésirable principal de cette molécule est lié à sa néphrotoxicité et son utilisation sous entend une bonne hydratation chez le patient ainsi que l'administration concomitante probénécide. D'autres effets secondaires survenant plus rarement ont été décrits : fièvre, asthénie, alopecies, uvéites antérieures, rash cutané, diminution de la pression intraoculaire ou neuropathie périphérique (Gandhi et al., 2004).



**Figure 8 : Les inhibiteurs de l'ADN polymérase virale** (d'après Alain et al., 2009)

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 VGCV 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.

- Foscarnet (PFA)

Le PFA ou phosphonoformate est un analogue du pyrophosphate inorganique. Il inhibe de façon réversible l'ADN polymérase de plusieurs herpesvirus en se fixant au site de liaison au pyrophosphate et en le bloquant (Wagstaff and Bryson, 1994). Cette inhibition non-compétitive interfère avec le clivage du pyrophosphate des desoxynucléosides triphosphates qui arrivent au niveau de l'enzyme et il en résulte une inhibition de la synthèse d'ADN viral (Crumpacker, 1992). Comme cette molécule agit directement sur l'ADN polymérase, elle ne requiert pas d'être activée par une enzyme cellulaire ou virale comme c'est le cas pour le GCV et le CDV. C'est un médicament qui est le plus souvent administré en deuxième intention chez les patients qui répondent mal à un premier traitement ou qui développent une

résistance au GCV. Son action est synergique à celle du GCV ce qui permet de l'utiliser en association avec celui-ci. Sa  $CI_{50}$  sur souche sensible est très variable et peut aller de 40  $\mu\text{M}$  à 400  $\mu\text{M}$ .

Les principaux effets indésirables de cette molécule touchent la fonction rénale (Torres-Madriz and Boucher, 2008) et son administration doit 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 de type nausées et vomissements sont aussi rapportés.

- Aciclovir (ACV) et valaciclovir (VCV)

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. Même si ces deux molécules possèdent un mode d'action proche, l'efficacité de l'ACV sur l'inhibition de la réplication du CMVH est moindre et cette molécule est utilisée uniquement dans le traitement prophylactique des infections à CMVH 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. Comme le GCV, l'ACV subit une première phosphorylation par la kinase virale UL97 puis il est phosphorylé deux autres fois par des kinases cellulaires et c'est sous cette forme tri-phosphorylée qu'il est actif.

Le VCV a une biodisponibilité par voie orale de 54%, 3 à 4 fois supérieur à celle de l'ACV. La demi-vie plasmatique de ces deux composés 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 comme des néphropathies réversibles et des troubles digestifs ou neurologiques.

- Le fomivirsén

Le fomivirsén (Vitravene<sup>®</sup>, 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 fomivirsén 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 (Vitragen 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.

#### b. Traitements des infections à CMV

Pour revue (Gérard and Salmon 2002; Legendre 2002; Milpied 2002, Hantz et al., 2009)

- Traitement curatif

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

Le GCV est utilisé par voie veineuse en traitement d'attaque des rétinites, des atteintes digestives, ou des colites, chez le patient infecté par le VIH, ou en traitement curatif après greffe d'organe, à la dose de 5 mg par kg 2 fois par jour pendant 2 à 4 semaines et jusqu'à cicatrisation des lésions oculaires (5 mg/Kg/12h/14-21j). Le taux de réponse clinique favorable est de 85 % pour le traitement des rétinites, 75 à 95 % pour les atteintes coliques et 70 à 85 % pour les atteintes digestives. Chez les patients greffés, une diminution du traitement immunosuppresseur parallèlement à l'administration de GCV peut permettre une guérison plus rapide de la maladie à CMV. Les immunoglobulines polyvalentes peuvent également être utilisées en complément du traitement par GCV par voie intraveineuse pour le traitement des pneumonies à CMV chez les transplantés de moelle osseuse. Cependant, dans certaines situations, des immunoglobulines spécifiques peuvent être préférables. L'efficacité de cette association est controversée mais en l'absence d'étude randomisée ne démontrant pas de bénéfice, cette association est toujours d'usage (Boeckh M et al, 2009)

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

Le VGCV est une alternative possible au GCV en I.V. à la dose de 900 mg x2/j pendant 3 semaines puis en entretien à 900 mg/j (Asberg et al. 2007)

Les rétinites peuvent aussi être traitées par des injections locales de GCV à la dose de 400 µg deux fois par semaine en traitement d'attaque et 400 µg par semaine en traitement d'entretien, par injections intravitréennes, ou par l'utilisation d'implants intravitréens. Ce traitement permet d'obtenir une cicatrisation après 3 semaines de traitement chez près de 80 % des patients. Cependant, 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.

Les autres molécules, CDV et PFA, sont administrées en cas d'échec du traitement par GCV ou d'effets indésirables tels que la neutropénie. Le CDV est administré à la dose de 5mg/kg une fois par semaine pendant 3 semaines puis en entretien à 5 mg/kg tous les 15 jours. Le PFA peut être utilisé par voie intraveineuse, à la dose de 90 à 100 mg/Kg/12h/14-21j. 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.

- Traitement préventif

Depuis la mise en place des traitements antirétroviraux hautement actifs, la prophylaxie primaire chez les sujets VIH+ ayant moins de 50 CD4+ n'est plus recommandée de façon systématique. Mais le CMV demeure la première cause des infections virales opportunistes chez les receveurs d'allogreffe. Les répercussions de cette infection pouvant être majeures jusqu'à la perte de l'organe greffé voire le décès du patient, un traitement préventif peut être administré et varie en fonction du statut immunitaire du patient. Deux modalités de traitement préventif sont actuellement préconisées : le traitement prophylactique et le traitement anticipé ou traitement préemptif. Le traitement prophylactique vise à prévenir la survenue de l'infection à CMV 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 CMV chez un receveur qui a développé une infection active à CMV.

Le traitement prophylactique s'adresse aux sujets à haut risque de développer une maladie à CMV. Dans cette indication, le VGCV a très largement remplacé le GCV (Paya et al., 2004). Il est utilisé à la dose de 450mg x2 /j. Le VCV, prodrogue de l'ACV, peut également être utilisé en prophylaxie tant en transplantation rénale (Lowance et al., 1999)

qu'en greffe de moelle (Ljungman, 2002) à la dose de 2 g x 4/j. L'ACV par voie intraveineuse, à la dose de 5 mg/kg x 3/j, est aussi utilisé pour la prophylaxie des infections à CMV et HSV chez le transplanté 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 CMV apparaissent au-delà du 100ème jour après un rebond de réplication virale, justifiant une surveillance virologique prolongée.

Le traitement préemptif est entrepris pour traiter les sujets développant une infection active asymptomatique détectée biologiquement par antigénémie pp65 ou par PCR avant le développement d'une maladie à CMV. Le traitement est alors effectué par administration orale de VGCV, à la dose de 900 mg/12h, ou par 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. La difficulté des traitements préemptifs est de définir le seuil biologique prédictif de la maladie à CMV à partir duquel initier le traitement. Ce choix thérapeutique nécessite une surveillance virologique étroite des patients greffés.

### III. Mécanismes de résistance du CMVH aux antiviraux

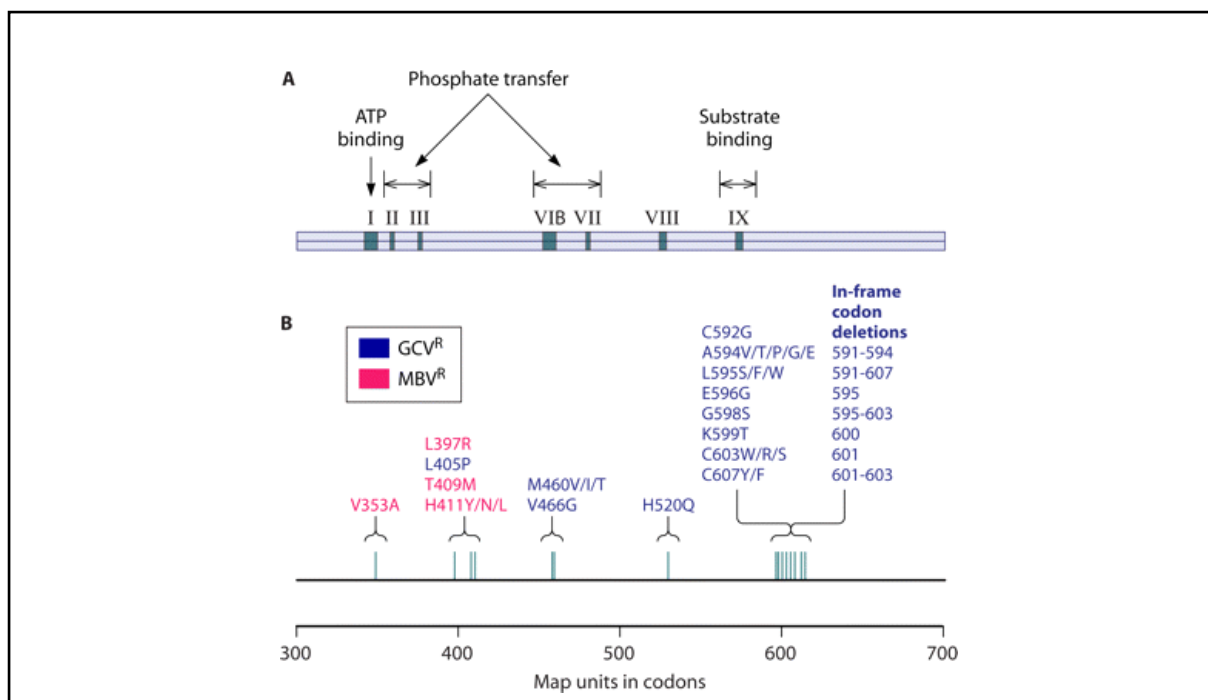
La caractérisation des mutations de résistance du CMVH a grandement contribué à l'amélioration des thérapies antivirales et des connaissances fondamentales concernant les produits des gènes viraux ciblées par les molécules utilisées. Les molécules actuellement distribuées au patient (GCV, VGCV, PFA et CDV) ont toutes pour cible l'ADN polymérase virale et avant même la mise sur le marché du ganciclovir, une souche résistante était isolée *in vitro* à partir de culture virale en présence de cette molécule (Biron et al., 2002). Peu de temps après les premières utilisations du GCV une souche résistante a aussi été isolée *in vivo* après le traitement prolongé d'un patient immunodéprimé (Erice et al., 1989). Chaque année de nouvelles souches résistantes de CMVH sont identifiées, des résistances étant décrites pour chacune des molécules citées précédemment. Pour une prise en charge optimale du patient la connaissance et l'identification de ces mutations est un besoin et cela passe le plus souvent aujourd'hui par le séquençage du gène *UL97* et du gène *UL54*. C'est l'étude de ces génotypages qui a permis de mettre en évidence les mutations les plus fréquentes impliquées dans la résistance, le niveau de résistance conféré par ces mutations, les éventuels phénomènes de résistance croisée et les mutations silencieuses.

#### 1. Les gènes ciblés par les molécules antivirales

##### a. La kinase UL97 (Figure 9)

Les premières analyses de séquences complètes de la souche de référence AD169 de CMVH suggérèrent que la protéine UL97 codée par *UL97* était une phosphotransférase du type protéine kinase. La séquence d'acides aminés d'UL97 contient des motifs fonctionnels communs aux sérine/thréonine kinases sur la base d'homologies avec un grand nombre de protéines kinases déjà caractérisées et provenant de divers organismes tels que les levures, les bovins, les rats et les humains (Chee et al., 1989 ; Hanks et al., 1988) avec le résidu lysine commun à toutes les kinases en position 355 pour UL97 mis en évidence par l'absence d'activité de phosphorylation des mutants K355Q (He et al., 1997) et K355M (Marschall et al., 2001).





**Figure 9 : Cartographie du gène *UL97*** (Lurain et Chou, 2010)

A : Domaines conservés d'*UL97* avec la région I du codon 338 au codon 345, la région II avec la lysine du site catalytique (K355), la région III avec le glutamate E380, la région VIB du codon 453 au codon 462, la région VII du codon 481 au codon 483, la région VIII du codon 520 au codon 527 et la région IX du codon 574 au codon 579.

B : Les mutations confirmées sont indiquées avec deux couleurs pour indiquer la molécule pour laquelle une résistance est développée. Quand plusieurs mutations concernent le même codon, elles sont listées dans l'ordre de leur fréquence.

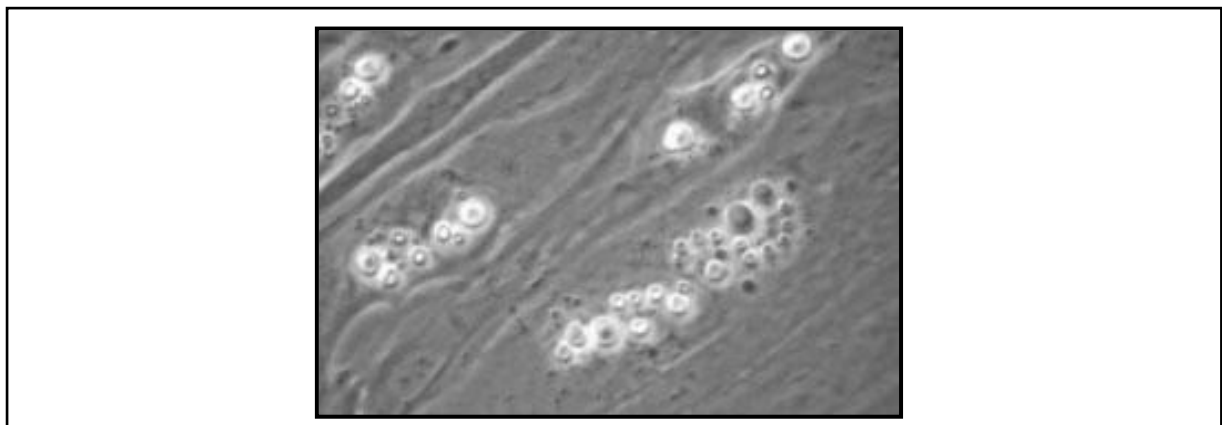
Le GCV, tout comme l'ACV sont des analogues de nucléosides qui sont phosphorylés dans les cellules infectées par HSV-1 et HSV-2 par une thymidine kinase codée par le virus. Le CMVH ne code pas de thymidine kinase et c'est *UL97* qui joue ce rôle et qui phosphoryle le GCV et l'ACV (Littler et al., 1992 ; Sullivan et al., 1992 ; Talarico et al., 1999) mais pas les nucléosides naturels (Michel et al., 1996).

*UL97* réalise la primo phosphorylation du GCV, première étape indispensable à l'acquisition de sa forme active tri-phosphorylée, les deux autres phosphates étant ajoutés par des enzymes cellulaires. La chaîne triphosphate possède un groupement hydroxyle libre qui permet la poursuite de l'élongation de la chaîne, cependant, l'incorporation du GCV phosphorylé par l'ADN polymérase virale altère la conformation de l'ADN ce qui ralentit, voir arrête la réplication (Crumpacker, 1996). Outre cette fonction, le rôle d'*UL97* dans le cycle viral est complexe et pas totalement élucidé. Elle est capable de s'auto-phosphoryler (Baek et al., 2002 ; He et al., 1997 ; Michel et Mertens, 2004) et entre dans la composition du virion

mature (Prichard et al., 2005). Le rendement des souches avec une délétion d'*UL97* est grandement réduit et les virions néoformés présentent des défauts de morphogénèse et de maturation. La microscopie électronique a révélé en particulier un défaut d'encapsidation et de sortie du noyau (Krosky et al., 2003 ; Wolf et al., 2001). On peut constater avec cette souche, des agrégats intranucléaires de pp65 et d'autres protéines du tégument (Kamil et Coen, 2007 ; Prichard et al., 2005) visibles par l'aspect anormal que ces agrégats donnent aux effets cytopathiques en culture cellulaire qui sont similaires à ce qui est parfois observé en présence de maribavir, un inhibiteur d'*UL97* (Figure 10) (Krosky et al. 2003 ; Prichard et al., 2005). Ni la délétion d'*UL97* ni le traitement au MBV n'empêchent totalement le virus de se répliquer. Il continue à se multiplier à des niveaux plus ou moins atténués en fonction des conditions de culture (Prichard, 2009).

Plus récemment l'étude des substrats potentiels d'*UL97* a révélé qu'*UL44*, facteur de processivité de l'ADN polymérase virale, est phosphorylée par *UL97* (Krosky et al., 2003 ; Marschall et al., 2003). *UL69*, le régulateur transcriptionnel et facteur d'exportation des ARNm est aussi substrat d'*UL97* et ces deux protéines interagissent physiquement provoquant la régulation de la fonction exportatrice d'ARNm d'*UL69* (Thomas et al., 2009).

La protéine suppresseur de tumeur du rétinoblastome (Rb) est un substrat cellulaire d'*UL97* (Hume et al., 2008 ; Prichard et al., 2008) et est inactivée par phosphorylation favorisant ainsi la réplication virale. Une autre protéine cellulaire, le composant lamine A/C de la lamina nucléaire, est phosphorylée par *UL97* et joue un rôle dans le réarrangement de



**Figure 10 : Effet cytopathique caractéristique de l'inhibition d'*UL97* par le MBV**  
Isolat clinique de CMVH en culture sur monocouche de cellules fibroblastiques sous 5 $\mu$ 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)

cette lamina pour permettre la sortie du noyau des nouvelles particules virales (Hamirally et al., 2009 ; Marschall et al., 2005).

Toutes ces données laissent penser qu'UL97 est une enzyme à large spectre d'action capable de phosphoryler des substrats viraux et cellulaires, ce qui explique son importance dans le bon déroulement du cycle viral et cette protéine se trouve fortuitement impliquée dans la phosphorylation du GCV.

#### b. UL54, l'ADN polymérase virale (Figure 11)

Parmi tous les gènes codés par le CMV se trouve l'ADN polymérase virale, UL54. Cette protéine possède des domaines fonctionnels conservés chez les ADN polymérases des herpesvirus (Teo et al., 1991) mais aussi d'autres organismes (Braithwaite et Ito, 1993). Grâce à ces homologies il a été possible de cartographier les mutations d'un point de vue fonctionnel. La structure obtenue par cristallographie la plus proche d'UL54 est l'ADN polymérase de l'HSV (Liu et al., 2006). Les régions homologues ont été nommées Exo I à Exo III (régions impliquées dans l'activité 3'-5' exonucléasique) et I à VII (régions impliquées dans l'activité polymérasique). Il existe aussi une autre région d'homologie entre les ADN polymérases des herpesvirus mais qui est aussi observée chez d'autres organismes, cette région est nommée  $\delta C$  (Zhang et al., 1991). Parmi toutes ces régions homologues, il y a des acides aminés qui sont très conservés même si on regarde chez de nombreux organismes.

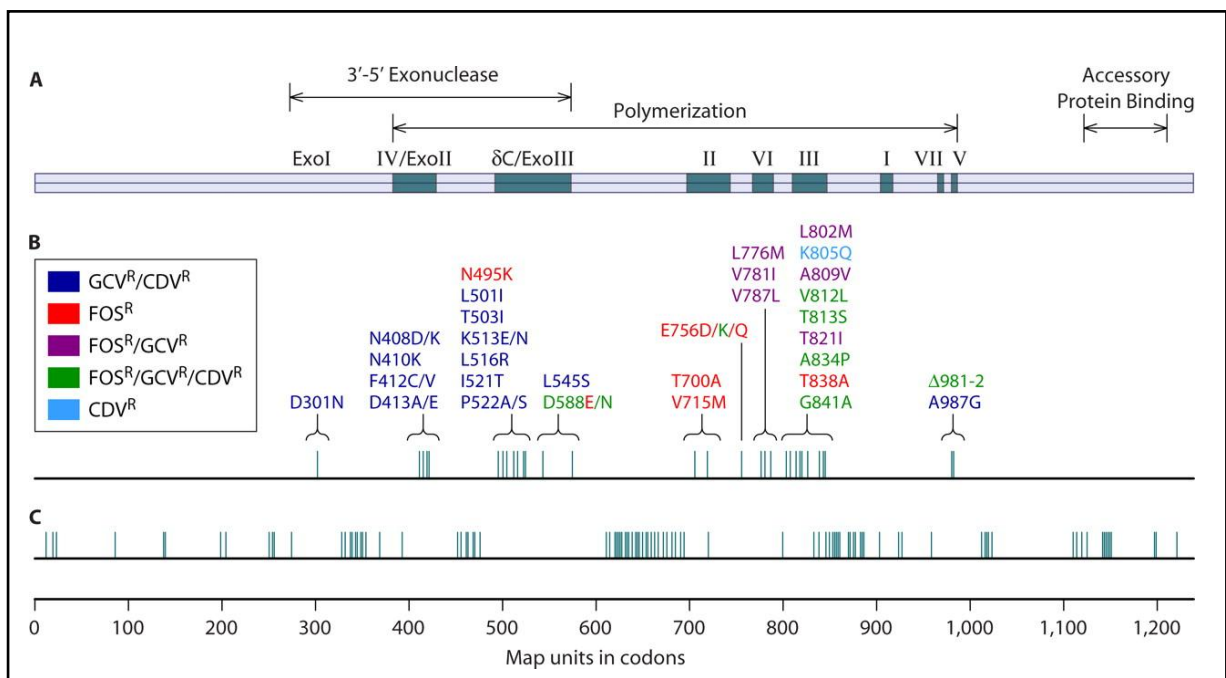
L'ADN polymérase virale est exprimée en phase précoce du cycle viral et est responsable de la réplication de l'ADN viral en conjugaison avec d'autres protéines comme la protéine accessoire de la polymérase : UL44 ; la protéine de liaison à l'ADN simple brin : UL57 et le complexe primase/hélicase : UL70, UL102 et UL105 (Anders et Gibson, 1988 ; Woon et al., 2008). Les séquences en acides aminés de toutes les protéines de ce complexe sont très conservées dans les différentes souches de CMVH. Les protéines UL44 forment des homodimères qui interagissent via leurs extrémités N-terminales avec l'extrémité C-terminale de l'ADN polymérase virale et les acides aminés impliqués dans ce processus sont totalement conservés (Woon et al., 2008).

Les principales fonctions associées à l'ADN polymérase virale sont :

- La polymérisation des nucléotides y compris le recrutement de chaque nouveau nucléotide triphosphate et le relargage du pyrophosphate.
- L'activité 3'-5' exonucléasique (activité correctrice) qui permet une haute fidélité de réplication et un taux de mutation très bas.

Les régions d'homologie sont liées à ces deux fonctions et il y a chevauchement entre la région Exo II et la région IV ainsi qu'entre la région Exo III et la région  $\delta$ C. La résistance aux antiviraux peut donc apparaître suite à des changements d'acides aminés impliqués dans la liaison entre la molécule thérapeutique et l'enzyme et diminuer leur affinité ou encore modifier l'équilibre entre activité polymérasique et exonucléasique pour favoriser le détachement de la molécule active (Cihlar et al., 1998 ; Hall et al., 1995 ; Teo et al., 1991).

Bien que la liaison des homodimères d'UL44 à la polymérase soit indispensable à son activité, aucune mutation de résistance n'est localisée dans la région d'interaction avec UL44 (Boutolleau et al., 2009). Ce phénomène donne de bons espoirs quant au développement de nouvelles molécules thérapeutiques inhibant la formation des dimères d'UL44 ou inhibant leur liaison à UL54 cette dernière interaction pouvant être supprimée par une seule substitution d'acide aminé (Loregian et al., 2004).



**Figure 11 : Cartographie du gène *UL54*** (Lurain et Chou, 2010)

A : Domaines fonctionnels de la polymérase virale du CMVH avec région IV/Exo II codons 379 à 421, région  $\delta$ C/Exo III codons 492 à 588, région II codons 696 à 742, région VI codons 771 à 790, région III codons 805 à 845, région I codons 905 à 919, région VII codons 962 à 970 et région V codons 978 à 988.

B : Mutations confirmées colorées en fonction de la molécule pour laquelle est développée la mutation

C : Polymorphisme observé chez les isolats sensibles

## 2. Les mutations liées à la résistance

### a. Les mutations identifiées sur les mutants de laboratoire

- Mutations sur *UL97*

La résistance au GCV fut la première à être décrite et son apparition a fait suite aux expériences de passages successifs de la souche de référence AD169 en culture en présence de GCV qui ont permis de mettre en évidence une souche 759rD100 10 fois moins sensible au GCV que la souche AD169 (Biron et al., 1986). Bien qu'à cette époque le mécanisme exact de résistance était inconnu, la diminution observée dans la phosphorylation du GCV sous entendait déjà l'implication d'une kinase. Les cosmides furent utilisés pour localiser la mutation de résistance. Cette mutation était localisée dans *UL97* et correspondait à une délétion des codons 590 à 593 résultant en une forte diminution de la phosphorylation du GCV (Sullivan et al., 1992) probablement suite à l'altération de la reconnaissance du substrat car le domaine de liaison à l'ATP et le domaine impliqué dans le transfert du phosphate n'étaient pas affectés. Plus tard une autre mutation, M460I, toujours obtenue en culture fut identifiée (Lurain et al., 1994) au niveau du site catalytique de la kinase. Les données cliniques ont depuis confirmé que c'est préférentiellement ce locus qui est touché par les mutations de résistance au GCV. La plupart des mutations d'*UL97* identifiées à partir des isolats cliniques et impliquées dans la résistance au GCV n'empêchent pas totalement la réplication du virus cependant elles limitent grandement la phosphorylation du GCV tout en maintenant l'activité kinase de cette enzyme à son niveau normal (Michel et al., 1998).

Le rôle d'*UL97* dans la phosphorylation du GCV implique que toute mutation qui supprime cette fonction va conférer une résistance au GCV et des résistances croisées aux molécules qui nécessiteraient d'être phosphorylées par *UL97* ou qui cibleraient cette protéine. Cela inclus les mutations de la lysine catalytique K355 (Marschall et al., 2001) ou des mutations qui modifieraient l'expression d'*UL97* (Chou et al., 2007 ; Michel et al., 1999). Une étude de mutagenèse dirigée sur les domaines fonctionnels d'*UL97* utilisant des recombinants du virus de la vaccine montre que les mutations G340V, A442V, L446R et F523C enlèvent l'activité kinase de cette enzyme car empêchent son autophosphorylation (Michel et al., 1999) et la phosphorylation du GCV. Cependant, de telles mutations ne sont pas supposées être retrouvées dans les isolats cliniques à cause du déficit sévère de croissance virale associé à ces pertes de fonction d'*UL97* (Prichard et al., 1999).

Sachant qu'UL97 phosphoryle aussi l'ACV (Talarico et al., 1999) des mutants sélectionnés après exposition à l'ACV pourraient posséder des résistances croisées au GCV et cette supposition a été confirmée par une étude *in vitro*. Trois isolats obtenus auprès de patients seulement traités par l'ACV ont montré une sensibilité au GCV diminuée et la mutation M460V déjà bien connue comme mutation de résistance classique au GCV a même été identifiée (Chou et al., 2002 ; Michel et al., 2001)

- Mutations sur *UL54*

Le premier mutant résistant au GCV, 759rD100, outre sa mutation sur *UL97* possédait aussi une mutation sur *UL54* dans la région V : A987G, conférant une résistance croisée au GCV et au CDV (Sullivan et al., 1993). Des études plus récentes ont permis d'identifier d'autres mutations apparaissant après exposition aux molécules thérapeutiques *in vitro* comme F412V, L501I, L545S et V812L après exposition au GCV (Cihlar et al., 1998 ; Gilbert et Boivin, 2005 ; Lurain et al., 1992), ces mutations conférant une résistance à cette molécule. Et beaucoup d'autres mutations ont aussi été décrites sans qu'il soit établi de lien avec les phénomènes de résistance.

b. Mutations observées *in vivo* après thérapie antivirale

- Mutations sur *UL97* (Tableau 1)

Des résistances au GCV furent identifiées chez trois patients peu de temps après les premières utilisations de cette molécule (Erice et al., 1989). Quand la fonction d'UL97 dans l'anabolisme du GCV fut connue, les mutations A594V et L595S chez ces patients furent caractérisées sur le gène de la kinase (Chou et al., 1995). Ces mutations sont depuis connues pour être les plus fréquentes dans les isolats résistants émergents après traitement au GCV. M460V a aussi été décrite dans les mêmes conditions à la même période (Chou et al., 1995). Les études par transfert de marqueurs ont confirmé que ces mutations conféraient un phénotype résistant au GCV et diminuaient la phosphorylation de cette molécule (Chou et al., 1995). La compilation des mutations de résistance au GCV sur *UL97* a montré que ces mutations sont étroitement restreintes aux codons 460, 520 et 590 à 607 avec plus de 80% des isolats résistants ayant une mutation dans ces codons après traitement initial au GCV (Chou et al., 2002 ; Schreiber et al., 2009). Les codons 591 à 607 apparaissent comme totalement indispensables (Chou et al., 2002) mais les mutations retrouvées au niveau de ces codons sont

Codon	Acides aminés		Mutant/sauvage	Références
	Sauvage	Mutant	GCV IS <sub>50</sub>	
<i>Mutations ponctuelles</i>				
405	L	P	2,5	Chou, 2010
<b>460</b>	<b>M</b>	<b>I</b>	5	Lurain et al., 1994
460	M	T	9,3	Chou, 2010
<b>460</b>	<b>M</b>	<b>V</b>	8,3	Chou et al., 2005
466	V	G	3,5	Martin et al., 2010
<b>520</b>	<b>H</b>	<b>Q</b>	10	Hanson et al., 1995
591	A	V	1,3	Chou et al., 2002
<b>592</b>	<b>C</b>	<b>G</b>	2,9	Chou et al., 2005
594	A	E	3	Chou, 2010
594	A	G	13,5	Bourgeois et al., 1997
594	A	T	2,7	Chou et al., 2002
<b>594</b>	<b>A</b>	<b>V</b>	8,3	Chou et al., 2005
595	L	F	15,7	Wolf et al., 1995
<b>595</b>	<b>L</b>	<b>S</b>	9,2	Chou et al., 2005
595	L	W	5,1	Chou et al., 2002
596	E	G	2,3	Chou et al., 2002
599	K	T	5,3	Khan et al., 1998
603	C	R	3,6-8,3	Chou, 2010
603	C	S	1,9	Chou, 2010
<b>603</b>	<b>C</b>	<b>W</b>	8	Chou et al., 1997
607	C	F	1,9	Chou et al., 2002
607	C	Y	12,5	Baldanti et al., 1998
<i>Délétions</i>				
591-594			3,0-10	Sullivan et al., 1992
595	L	-	13,3	Baldanti et al., 1995
595-603	LENGKLTHC	-	8,4	Chou et al., 2000
600	L	-	1,9	Chou et al., 2002
601-603	THC	-	11	Marfori et al., 2007

**Tableau 1 : Mutations dans *UL97* conférant une augmentation de la CI<sub>50</sub> après transfert à une souche sauvage**

IS<sub>50</sub> (index de sensibilité 50%) = CI<sub>50</sub> souche/ CI<sub>50</sub> AD169. Les mutations les plus communément retrouvées et dites « canoniques » sont représentées en gras.

diverses et confèrent une grande variété de niveau de résistance allant de l'absence de résistance (D605E) à une CI<sub>50</sub> multipliée par 15 (L595F). Les mutations dans cette région empêchent la reconnaissance du GCV comme substrat sans modifier les fonctions biologiques normales de cette kinase. Les mutations dans les codons 460 et 520 sont quant à elles localisées dans des domaines conservés impliqués dans l'activité enzymatique ce qui explique la plus faible proportion de ces mutations. Des études récentes tendent à montrer que les

mutations de résistance en dehors de ces régions privilégiées sont encore plus rare que prévu (Chou, 2010 ; Martin et al., 2010). Les mutations L405P et V466G confèrent de faibles résistances au GCV et s'il n'a pas été déterminé que la croissance virale était altérée avec la mutation V466G, pour L405P aucune anomalie n'a été constatée (Michel et al., 1999).

Concernant l'incidence de l'utilisation de l'ACV sur l'émergence de résistance au GCV *in vivo*, une première étude basée sur des essais antiviraux sur des isolats cliniques de CMVH isolés chez des patients ayant reçu de fortes doses prolongées d'ACV n'a pas permis d'identifier de résistance au GCV (Drew et al., 1995) contredisant ainsi les prédictions émises suite à la caractérisation d'un des trois premiers cas de patients résistants au GCV ayant déjà été traité à l'ACV et ayant déjà développé une résistance vis-à-vis de cette molécule (Erice et al., 1989). Plus récemment une étude menée chez les patients transplantés rénaux a mis en évidence 4% de souches résistantes au GCV après traitement en prophylaxie au VCV, ce qui représente un phénomène non rare mais possible (Alain et al., 2004).

- Mutations sur *UL54* (Tableau 2)

Une large variété de mutations sur *UL54* a été retrouvée suite à l'analyse d'isolats présentant des résistances aux molécules thérapeutiques. L'apparition de mutations sur l'ADN polymérase virale est fréquente *in vivo* après traitement prolongé au GCV (Smith et al., 1997) et peut augmenter le niveau de résistance déjà conféré par des mutations sur *UL97* (Chou et al., 2005). L'apparition d'une mutation sur la polymérase sans mutation préalable sur *UL97* après traitement prolongé au GCV est assez rare mais a déjà été constaté (Boivin et al., 2005 ; Erice et al., 1997). Aujourd'hui plusieurs dizaines de mutations ont été décrites et celles-ci confèrent des niveaux variés de résistances croisées. Les mutations croisées GCV-CDV sont plutôt localisées dans le domaine exonucléasique et la région V alors que celles conférant une résistance au PFA sont assez disparates mais plutôt concentrées aux alentours et dans les régions II et III. Quelques mutations proches de la région III ou dans celle-ci confèrent une résistance au PFA accompagnée d'une légère résistance au GCV et quelques-unes comme A834P et  $\Delta$ 981-2 confèrent une résistance modérée au GCV, PFA et CDV. Contrairement à *UL97* il n'y a pas de région dans laquelle on puisse situer des mutations dites « canoniques » de plus, l'important polymorphisme entre les souche dans le gène de la polymérase rend le travail d'identification des réelles mutations confèrents une résistance difficile (Chou et al., 1999 ; Fillet et al., 2004). Cependant la majorité de ces mutations est localisée dans les régions d'homologies et souvent restreinte aux acides aminés très conservés au sein des polymérases des herpesvirus et d'autres organismes (Teo et al., 1991; Braithwaite et Ito,1993)



Région	Acides aminés			Mutant/sauvage			Références
	Codon	Sauvage	Mutant	GCV IS <sub>50</sub>	CDV IS <sub>50</sub>	FOS IS <sub>50</sub>	
ExoI	301	D	N	<b>2,6</b>	<b>3</b>	0,5	Chou et al., 2003
ExoII	408	N	D	<b>4,9</b>	<b>5,6</b>	1,3	Cihlar et al., 1998
	408	N	K	<b>4,2</b>	<b>21</b>	0,7	Scott et al., 2007
	410	N	K	<b>2,9</b>	<b>3</b>	0,8	Chou et al., 2003
	412	F	C	<b>4,2</b>	<b>18</b>	1,2	Lurain et al., 1992
	412	F	V	<b>4,3</b>	<b>15,5</b>	1,1	Cihlar et al., 1998
	413	D	A	<b>6,5</b>	<b>11</b>	0,8	Marfori et al., 2007
	413	D	E	<b>4,8</b>	<b>4,3</b>	0,8	Chou et al., 2003
	IV	495	N	K	1,1	1,1	<b>3,4</b>
ExoIII	501	L	I	<b>6</b>	<b>9,1</b>	1,4	Smith et al., 1997
	503	T	I	<b>2,9</b>	<b>6,1</b>	0,5	Chou et al., 2003
	513	K	E	<b>5</b>	<b>9,1</b>	1,4	Smith et al., 1997
	513	K	N	<b>6</b>	<b>12,5</b>	1,1	Cihlar et al., 1998
	516	L	R	<b>2,1</b>	<b>5,1</b>	0,8	Chou et al., 2003
	521	I	T	<b>3,1</b>	0,9	<b>3,9</b>	Eckle et al., 2000
	522	P	A	<b>3</b>	<b>4,1</b>	1	Erice et al., 1997
	522	P	S	<b>3,1</b>	<b>3,6</b>	1,1	Cihlar et al., 1998
	545	L	S	<b>3,5</b>	<b>9,1</b>	1,2	Cihlar et al., 1998
	588	D	E	1,3	1,1	<b>2,3</b>	Cihlar et al., 1998
	588	D	N	<b>3,8</b>	<b>2,7</b>	<b>3,2-9</b>	Gilbert et Boivin, 2005 ; Chou et al., 2005
II	700	T	A	0,9	1,5	<b>4,7</b>	Cihlar et al., 1998
	715	V	M	1	1,1	<b>5,5</b>	Cihlar et al., 1998
	756	E	D	1,2	0,7	<b>3,4</b>	Chou et al., 2003
	756	E	K	<b>3,5</b>	<b>2,2</b>	<b>&gt;8</b>	Chou et al., 2003
	756	E	Q	1,7	1	<b>4,3</b>	Weinberg et al., 2003
VI	776	L	M	<b>2,5</b>	1	<b>3,5</b>	Shapira et al., 2008
	781	V	I	1-4	1,2	<b>4-5,2</b>	Cihlar et al., 1998 ; Moussavi-Javi et al., 2001
	787	V	L	<b>2,4</b>	1	<b>4,1</b>	Weinberg et al., 2003
III	802	L	M	1,1-3,5	0,9-1,8	<b>3,2-10,8</b>	Chou et al., 1997 ; Cihlar et al., 1998
	805	K	Q	1	<b>2,2</b>	0,18	Cihlar et al., 1998
	809	A	V	<b>2,6</b>	1,7	<b>6,3</b>	Chou et al., 1997
	812	V	L	<b>2,5</b>	<b>3,2</b>	<b>2,9</b>	Cihlar et al., 1998
	813	T	S	<b>2,5</b>	<b>2,7</b>	<b>4,9</b>	Chou et al., 2007
	821	T	I	<b>4,5</b>	1,9	<b>21</b>	Smith et al., 1997
	834	A	P	<b>5,4</b>	<b>3</b>	<b>6,4</b>	Scott et al., 2007
	838	T	A	1,8	0,8	<b>2,4</b>	Springer et al., 2005
	841	G	A	<b>3,2</b>	<b>2,6</b>	<b>4,3</b>	Chou et al., 2007
V	981-982	DL	-	<b>8,3</b>	<b>2,8</b>	<b>3,6</b>	Chou et al., 2000
	987	A	G	<b>5,3</b>	<b>11,3</b>	1,2	Cihlar et al., 1998

**Tableau 2 : Mutations d'UL54 et résistance aux antiviraux**

IS<sub>50</sub> (index de sensibilité 50%) = CI<sub>50</sub> souche/ CI<sub>50</sub> AD169. Les IS<sub>50</sub> qui traduisent une résistance sont représentées en gras. Quand les valeurs divergent, les références respectives sont indiquées

Au contraire le polymorphisme constaté est le plus souvent restreint aux zones entre ces régions. Aucune mutation de résistance n'a encore été détectée dans les régions I et VII. Contrairement à ce qui est observé avec *UL97*, une atténuation, voire un retard dans la croissance virale, sont parfois observés avec les souches résistantes mutées dans *UL54* (Baldanti et al., 1996 ; Cihlar et al., 1998 ; Chou et al., 2007) et cela va de pair avec le fait que *UL54* ne soit que la cible secondaire des mutations de résistance.

## **IV. Perspectives thérapeutiques**

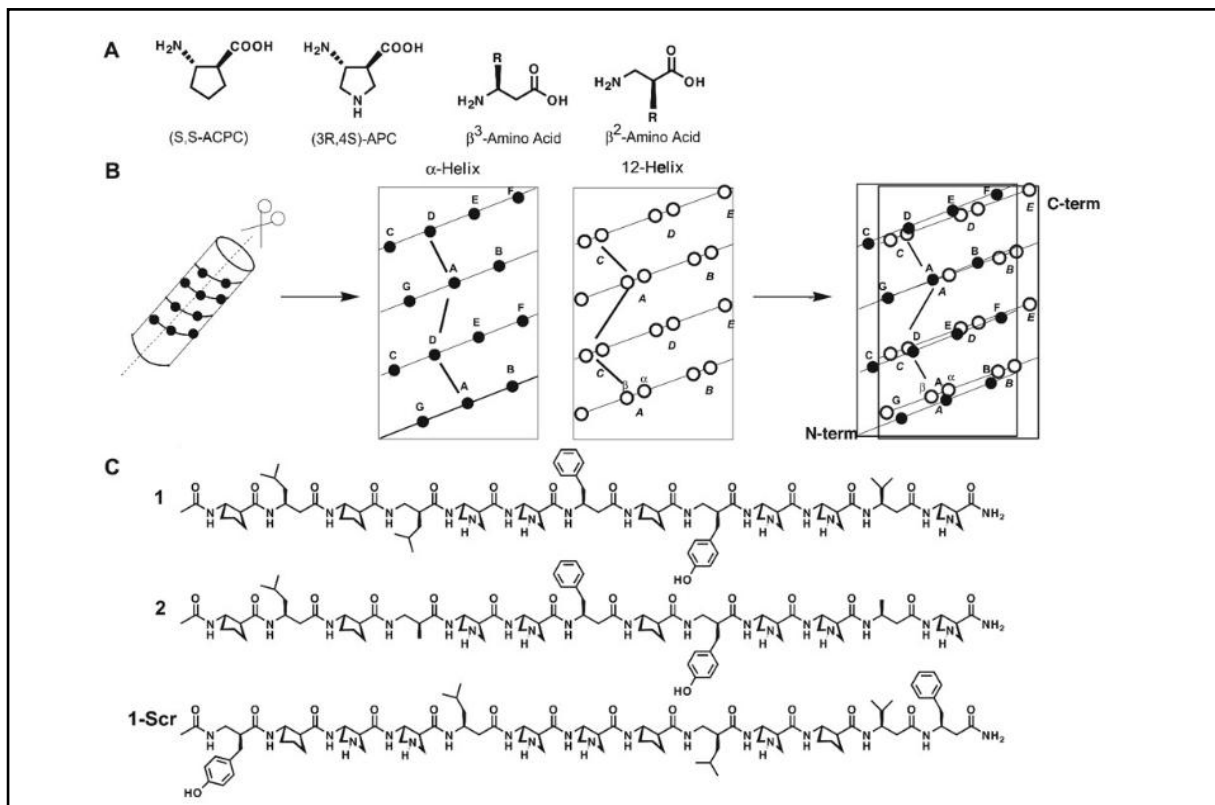
De nombreuses avancées ont été faites ces dernières années en termes de traitement de nombreuses infections par des membres de la famille des herpesvirus. L'importante efficacité de l'acyclovir et du famciclovir contre les infections dues à l'herpès simplex virus (HSV) et le varicelle-zona virus (VZV) montrèrent les premiers la possibilité de thérapies antivirales réellement efficaces et sont toujours utilisées en routine pour lutter contre ces infections (Dworkin et al. 2007 ; Leung et Sacks, 2000). Malheureusement peu de molécules sont utilisées contre les autres herpesvirus et le besoin de nouveaux traitements se fait sentir. Le CMVH partage de nombreuses caractéristiques avec les autres herpesvirus mais toutefois un certain nombre de différences comme la lenteur du cycle répliatif de celui-ci, le grand nombre de gènes codés, ainsi que le polymorphisme important retrouvé dans sa séquence en font une cible à part. L'activité modérée des molécules utilisées ainsi que la limite imposée à leur dosage en raison de leur importante toxicité limite grandement leur utilisation, qui de plus, s'accompagne souvent de l'apparition de mutations de résistance du virus. Il existe un grand besoin de nouvelles molécules qui cumulent une activité forte et spécifique à une faible toxicité afin d'améliorer l'arsenal nécessaire à la suppression de la réplication virale au sein d'une population donnée. La recherche a permis de mettre en évidence un certain nombre d'inhibiteurs avec des activités antivirales supérieures à celles des molécules déjà utilisées seulement, aucune n'a montré une réelle activité clinique. Certaines molécules sont en cours d'essais cliniques, nous allons les décrire plus en détail.

Le cycle de réplication du CMV est complexe et tous les protagonistes qui y jouent un rôle sont autant de cibles potentielles à de nouveaux antiviraux. En effet la recherche n'est plus seulement centrée sur des inhibiteurs de l'ADN polymérase virale. Désormais la recherche s'est diversifiée et en même temps que la compréhension du cycle viral s'améliore et se précise, on voit poindre des molécules qui possèdent d'autres cibles.

### **1. Inhibiteurs de l'attachement du virus**

La réplication du CMV débute avec l'attachement du virion à la surface de la cellule hôte. Cet attachement est médié par les glycoprotéines virales de l'enveloppe et aboutit à la pénétration de la nucléocapside dans le cytoplasme (Britt et Mach, 1996). Certaines préparations à base d'immunoglobulines seraient capables de neutraliser le CMV et

interféreraient avec l'attachement du virion à la cellule hôte. Toutefois leur efficacité sur des patients transplantés semble anecdotique et trop peu étudiée pour en tirer des conclusions (Sokos et al., 2002). Des thérapies plus spécifiques dirigées contre la glycoprotéines B (gB) ont été développées (Compton et al., 1993). Des inhibiteurs de la fusion membranaire ont aussi été testés, il s'agit d'oligomères d'acides aminés  $\beta$  qui miment les motifs de sept acides aminés répétés que l'on retrouve sur la gB (Figure 12) (English et al., 2006). Ces inhibiteurs sont spécifiques du CMV, ils empêchent la fusion et interagiraient avec les segments de sept acides aminés répétés de gB et gH, bloquant ainsi leurs associations homo et hétéro protéiques nécessaires à la fusion des membranes. Une petite molécule inhibitrice, CFI02 (Figure 13) a aussi été identifiée. Celle-ci est capable de bloquer la fusion des membranes et elle peut interférer avec la propagation du virus de cellule à cellule (Jones et al., 2004). Aller plus en avant dans le développement de nouvelles thérapies ciblant l'attachement du virus demande de passer à des essais cliniques car les modèles animaux de l'infection à CMV sont pour le moment inadaptés à l'étude d'une telle approche.

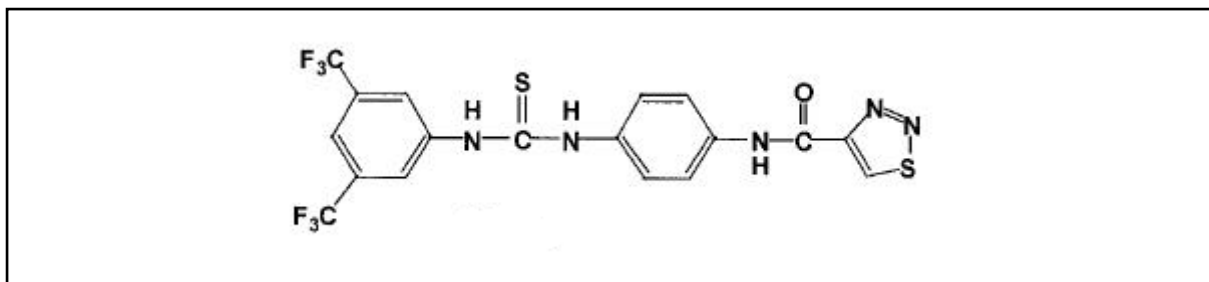


**Figure 12 : Structure des inhibiteurs de la fusion membranaire à base d'oligomères d'acides aminés  $\beta$**  (English et al., 2006)

A : Structure des acides aminés  $\beta$

B : Projection plane des hélices  $\alpha$  (points noirs et lettres en gras) et hélices 12 (points blancs et lettres en italique) et leur superposition ; les points indiquent la position des carbones  $\alpha$  (points noirs) ou des carbones  $\alpha$  et  $\beta$  (points blancs)

C : Structure des composés de première génération retenus



**Figure 13** : Structure chimique du composé CFI02 (Jones et al., 2004)

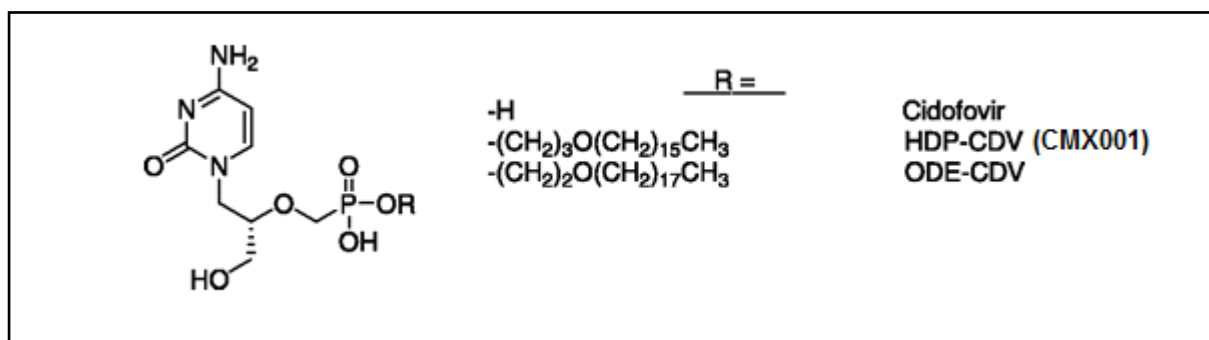
## 2. Inhibiteurs de la synthèse d'ADN

La synthèse de l'ADN viral représente l'étape suivante en tant que cible potentielle d'inhibition dans le cycle viral. Outre les molécules utilisées actuellement (GCV, CDV et PFA) de nombreux autres composés semblent actifs pour inhiber l'ADN polymérase virale, d'autres dérivés de nucléosides mais aussi des molécules appartenant à d'autres familles (Wathen, 2002). Une classe de nouvelles molécules très actives, les nucléosides phosphonates acycliques semblent pour certains avoir une activité antivirale notamment contre le CMV (De Clercq et Holy, 2005). L'efficacité de ces composés peut aussi être énormément augmentée par la formation de leurs pro-drogues qui sont des esters alkoxyalkyl et pour lesquels sont optimisés la pharmacocinétique ainsi que la biodisponibilité (Hostetler, 2009).

### a. CDV, CMX001 et autres analogues de nucléosides phosphates

Le CDV a une meilleure activité *in vitro* et *in vivo* contre le CMV que tout autre molécule utilisée en pratique clinique (Hitchcock et al., 1996 ; Kern, 1991 ; Kern et al., 2001 ; Snoeck et al., 1998) et cette molécule est utilisée dans le traitement des rétinites à CMV. Mais en dépit de son excellent potentiel antiviral, le CDV souffre de lacunes : sa faible biodisponibilité, sa toxicité qui impose des limites à son dosage et la néphro-toxicité sévère qui résulte souvent de son utilisation (Lalezari et al., 1997 ; Safrin et al., 1997). La synthèse et l'utilisation d'alkylglycerol phosphate ou d'ester d'alkylpropyl phosphates d'ACV, de penciclovir ou de GCV ont montré une très bonne activité antivirale quand ces molécules étaient administrées oralement à des modèles animaux d'infection à HSV, à CMV, ou à des modèles d'infections hépatiques (Hostetler, 2009 ; Hostetler et al., 1997 ; Hostetler et al., 2001). Une approche semblable a été menée pour montrer la biodisponibilité orale du CDV et d'une série d'analogues ester lipidiques d'ether du CDV ou du CDV cyclique. Ces composés étaient testés contre des herpesvirus et des poxvirus (Beadle et al., 2002 ; Keith et al., 2004).

Principalement grâce à leur biodisponibilité accrue, ces séries de molécules esters lipidiques d'éther, prodrogues du CDV et en particulier l'hexadécyloxypropyl CDV (connu aujourd'hui sous le nom de CMX001) et l'octadécyloxyethyl CDV (ODE-CDV) possèdent un bien meilleur potentiel antiviral *in vitro* que la molécule d'origine (Figure 14), ceci contre tous les herpesvirus humains y compris le CMV (Williams-Aziz et al., 2005). Par exemple, certains de ces analogues, notamment le CMX001, seraient même 1000 fois plus puissants *in vitro* que le CDV contre le CMV humain et le CMV murin (Wan et al., 2005). Les analogues conservent leur activité contre les isolats cliniques présentant des mutations de résistance sur les gènes UL97 et UL54 et demeurent actifs contre les isolats résistants au GCV. D'autre part le CMX001 et l'ODE-CDV montrent tous deux des activités significativement accrues contre les virus vaccinia et cowpox (Keith et al., 2004) leur efficacité ayant été démontrée en pharmacocinétique après administration par voie orale (Ciesla et al., 2003) et en activité antivirale sur la souris (Kern et al., 2004 ; Quenelle et al., 2004). Enfin, ces composés sont aussi actifs contre d'autres virus à ADN, notamment le virus BK et des adénovirus (Hartline et al., 2005 ; Randhawa et al., 2006).



**Figure 14 :** Structure chimique du cidofovir et des deux de ses dérivés ester lipidiques d'éther actifs *in vitro* contre le CMV (Hostetler et al., 2009)

En raison de sa spécificité d'hôte très étroite, il n'existe pas de modèle animal qui simule avec précision l'infection à CMVH. Les virus de rongeurs (CMVM, CMV de rat et CMV de cochon d'inde) ont été utilisés pour les tests précliniques de ces nouvelles thérapies potentielles (Bravo et al., 2006 ; Glasgow et al., 1982 ; Kern 1991 ; Kern et al., 2004 ; Li et al., 1990 ; Stals et al., 1991). Dans les modèles de CMVM le CDV et ses analogues alkoxyalkyl ont de meilleures activités antivirales que le GCV (Kern, 1991). De plus le CDV et les analogues phosphonates ont aussi une bonne activité thérapeutique contre les infections à CMVH dans les modèles de souris SCID greffées avec du tissu rétinien ou de thymus/foie (Bidanset et al., 2004 ; Kern et al., 2001).

Dans de nombreuses expériences l'efficacité du CMX001 et de l'ODE-CDV distribués par voie orale, a été comparée avec celle du GCV distribué par voie parentérale. Les analyses ont porté sur leur capacité à altérer la mortalité et la réplication du virus au sein d'organes de souris infectées par le CMVM (Kern et al., 2004). Alors que le CDV a une longue demi-vie intracellulaire (Cundy et al., 1996), il continue d'avoir une efficacité quand il est administré au souris une à trois fois par semaine au lieu de une ou deux fois par jour (Kern, 1991 ; Quenelle et al., 2003). Dans les mêmes conditions, les esters lipidiques d'éther comme CMX001 sont tout aussi efficaces avec une mortalité moindre des souris, cela, que le médicament soit donné une fois par jour, deux fois par semaine ou suite à une seule prise (Kern et al., 2004).

Des études approfondies *in vivo* portant sur le CMX001 ont confirmés que ce composé est actif contre le CMVM quand il est administré par voie orale (Kern et al., 2004) et le CMV (Bidanset et al., 2004), les orthopoxvirus (Parker et al., 2008 ; Quenelle et al., 2004) et contre des adénovirus (Toth et al., 2008). De plus, des combinaisons de CMX001 avec le ST-246, un inhibiteur de la phase tardive de la réplication des poxvirus ont montré une synergie quant à la diminution de la mortalité des animaux infectés avec le virus cowpox confirmant les résultats *in vitro* (Quenelle et al., 2007).

L'activité antivirale des esters alkoxyalkyl d'HPMPA (Hydroxy 2 Phosphonomethoxy Propyl Adenine) a aussi été confirmée *in vivo* contre le CMV et le CMVM (Quenelle et al., 2008) de même que contre les orthopoxvirus (Quenelle et al., 2007). Les alkoxyalkyl dérivés du 9-(S)-(3-hydroxy-2-phosphonomethoxypropyl)adénine ont aussi montré une activité antivirale contre le CMV et les orthopoxvirus (Beadle et al., 2006), de même que les esters alkoxyalkyl de phosphonopropoxymethyl-guanine et phosphonopropoxymethyl-diaminopurine qui ont de plus une activité anti HSV (Ruiz et al., 2006, 2007). Une stratégie similaire utilisant en parallèle les nucléosides 5-phosphono-pent-2-en-1-yl et leurs dérivés phosphonoester alkoxyalkyl mettant en évidence une activité contre le CMV et d'autres virus à ADN (Choo et al., 2007). En réalité, cette approche, tend à montrer, d'une manière générale, l'augmentation d'activité antivirale résultant de l'utilisation de ces esters plutôt que les purines et pyrimidines phosphonates d'origine, aussi bien contre le HIV (Valiaeva et al., 2006), que contre les herpesvirus (Prichard et al., 2008). Par ce procédé, l'augmentation d'activité antivirale significativement élevée et le spectre d'action étendu de ces molécules, donnent de bons espoirs quant au développement de nouvelles thérapies antivirales à large spectre d'activité.

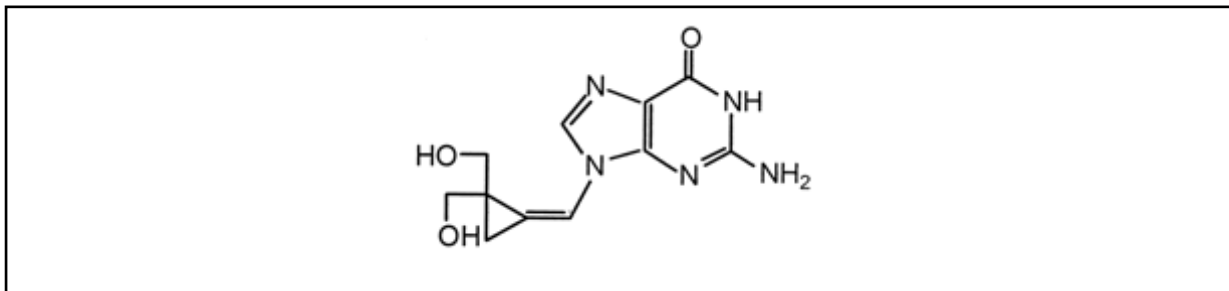
A partir de tous les résultats pharmacocinétiques, métaboliques et toxicologiques de ces études menées *in vitro* et sur modèle animal, le CMX001 a été retenu comme candidat pour les essais cliniques (Painter et Hostetler, 2004 ; Painter et al., 2008) et cette molécule a passé avec succès la phase 1 de ces essais. Le CMX001 est bien toléré et ne s'accumule de façon significativement moindre dans le rein que son parent le CDV (Ciesla et al., 2003 ; Painter et al., 2008 ; Quenelle et al., 2010). CMX001 est maintenant en cours d'essais cliniques de phase 2 en vue de confirmer son activité antivirale contre le BK virus et contre le CMV (Identifiants d'essais cliniques : NTC00793598 et NTC00942305).

#### b. Cyclopropavir et autres analogues du méthylencyclopropane

Les analogues méthylencyclopropanes représentent une nouvelle classe de molécules présentant des propriétés antivirales (Zemlicka, 1993). Les molécules de la première génération de ces analogues étaient des analogues bioisostériques de l'acyclovir pour lesquelles le groupement C-O-C était remplacé par un groupement méthylencyclopropane. Pour les molécules de seconde génération, il s'agit plutôt d'analogues du ganciclovir (Zhou et al., 2004). Aussi bien les isomères Z que E furent synthétisés pour chaque série de composés et les isomères Z des molécules de première génération ont montré un fort potentiel inhibiteur contre certains herpesvirus (Chen et al., 2003 ; Kushner et al., 2003 ; Qiu et al., 2000 ; Rybak et al., 2000). Les premiers virus contre lesquels une activité a été constatée avec ces molécules furent le CMV, le CMVM, le CMV de rat, le CMV de singe rhésus, le CMV de cochon d'inde (Rybak et al., 2000) , l'HHV-6 et l'HHV-8 (Kushner et al., 2003). Et certaines de ces molécules ont permis une réduction significative de la mortalité et de la réplication virale sur les animaux modèles d'étude des CMVH et CMVM (Kern et al., 2004 ; Rybak et al., 1999). Plus récemment, des analogues de seconde génération, qui sont des dérivés 2,2-bis-hydroxyméthyl ont été synthétisés (Zhou et al., 2004). Un de ces composés, le ZSM-I-62, rebaptisé cyclopropavir (CPV), a été étudié en détail car son utilisation a conduit à prévenir la mortalité des souris infectées par le CMVM tout en réduisant grandement la réplication du virus dans les organes des souris infectées, phénomène aussi rapporté pour les souris SCID infectées par le CMVH (Kern et al., 2004). Ce composé (Figure 15) possède en outre une activité antivirale *in vitro* contre le CMV, HHV-6A, HHV-6B et HHV-8 (Kern et al., 2005). Pour le cas des infections à CMV, ce composé requiert la kinase virale UL97 pour potentialiser son activité mais n'en demeure pas moins actif contre les souches déjà résistantes au GCV.



Des études plus poussées indiquent que les analogues phosphonate du cyclopropavir ont aussi une activité anti-CMV et restent actifs contre les souches mutées dans UL97, résistantes au GCV (Mhaske et al., 2009). Les esters de valine de CPV semblent aussi avoir des paramètres pharmacocinétiques optimisés en comparaison de la molécule d'origine (Wu et al., 2009). Enfin, d'autres analogues méthylencyclopropanes qui sont halogénés auraient aussi une activité antivirale in vitro contre le CMV, le HSV, le VZV et l'EBV (Zhou et al., 2007 ; Zhou et Zemlicka, 2007). Le fer de lance de toutes ces sous familles de molécules : le CPV est en passe d'entrer en essais clinique de phase 1.



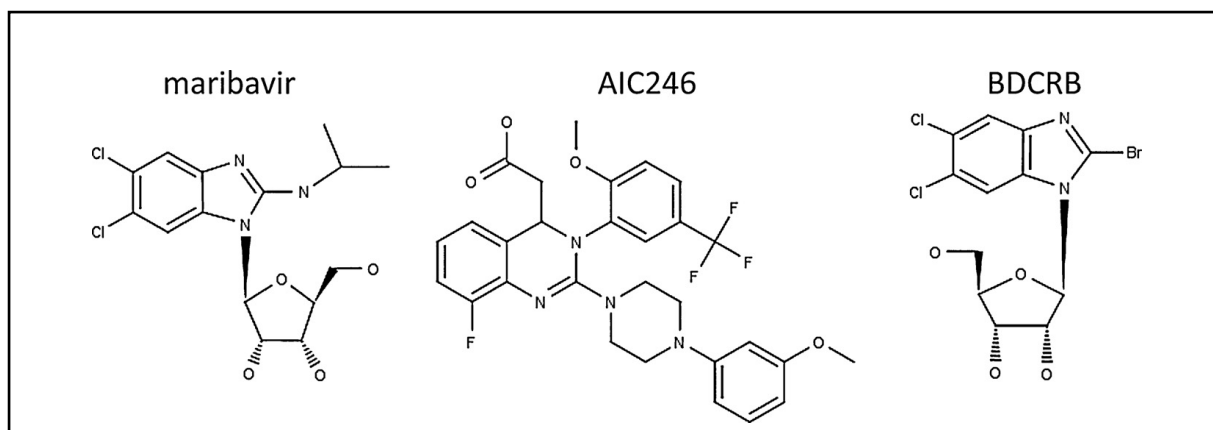
**Figure 15 : Formule chimique du composé ZSM-I-62, appelé cyclopropavir (CPV)**

### 3. Inhibiteurs du clivage et de l'empaquetage de l'ADN viral

Une quantité considérable d'ADN viral s'accumule pendant la réplication virale, et une faible proportion est empaquetée pour former des virions matures. L'ADN est néosynthétisé sous forme de concatémères et nécessite des processus de clivage et d'empaquetage pour qu'une unité de génome viral soit incorporée à l'intérieur d'une capsid néosynthétisée à l'origine d'un nouveau virion. Les terminases comprenant les protéines virales UL89 et UL56 et la protéine portail UL104 forment un complexe qui va intervenir dans ces processus de clivage et d'empaquetage de l'ADN. Ces cibles protéiques de mieux en mieux connues offrent un nouveau panel de possibilité quand à de nouvelles thérapies antivirales. Parmi les nouvelles molécules en développement, trois en particulier semblent très prometteuses : le maribavir, AIC246 et le BDCRB (Figure 16).

#### a. Les dérivés benzimidazolés

Les analogues benzimidazolés halogénés furent les premières molécules identifiées à bloquer les étapes de clivage et d'empaquetage de l'ADN viral et furent rapidement rendues



**Figure 16 : Inhibiteurs de phase tardive du cycle de réplication du CMVH**

responsables du défaut de formation de monomères de génome viral au sein des cellules infectées (Underwood et al., 1998). Le prototype de cette série de composé est le 1H- $\beta$ -D-ribofuranosyl-2-bromo-5,6-dichlorobenzimidazole (BDCRB). C'est un excellent inhibiteur de la réplication du CMV aussi bien *in vitro* (Townsend et al., 1995) que *in vivo* (Kern et al., 2004). Dans les cellules infectées traitées avec du BDCRB, l'empaquetage de l'ADN est initié, mais le signal de clivage n'est pas reconnu (McVoy et Nixon, 2005). Bien que cette molécule soit un analogue de nucléoside, elle ne nécessite pas d'être phosphorylée pour avoir une activité antivirale (Krosky et al., 2002) et prend pour cible les terminases (Krosky et al., 1998). La dégradation rapide de cette molécule par la 8-oxoguanine ADN glycosylase et par la N-méthylpurine ADN glycosylase ont compromis la poursuite des tests sur cette molécule (Lorenzi et al., 2006). Toutefois un analogue plus stable, GW275175X a été synthétisé et semble tout aussi actif contre le CMV (Kern et al., 2004 ; Williams et al., 2003) avec un mécanisme d'action similaire au BDCRB (Underwood et al., 2004). Dans cette famille de molécule GW275175 semble être la plus prometteuse mais pour le moment aucun essai clinique n'est programmé.

#### b. BAY 38-4766

Une autre série de composés ont été identifiés comme inhibiteurs de l'empaquetage de l'ADN du CMV. Le composé le plus prometteur de cette série est BAY 38-4766 (Reefschlaeger et al., 2001). L'activité antivirale de ce composé est meilleure que celle du BDCRB et possède une activité efficace sur les souris infectées par le CMVM. Cette molécule possède de bonne caractéristiques pharmacocinétiques et est bien tolérée chez les animaux qui y ont été soumis (McSharry et al., 2001). En dépit de sa grande différence structurale avec le

BDCRB cette molécule utilisée sur le long terme laisse apparaître des mutations de résistances au niveau des gènes codant UL56 et UL89 identifiant de ce fait une action ciblée sur ces protéines et donc sur le clivage et l’empaquetage de l’ADN viral (Buerger et al., 2001).

#### c. AIC246

Une troisième série de molécules antivirale agissant tardivement dans le cycle de réplication viral a été récemment décrite et AIC246 est la plus étudiée de ces molécules (Lischka et al., 2010). Même si pour le moment rien ne prouve clairement que ces molécules agissent directement sur le complexe des terminases il n’en demeure pas moins qu’elles interfèrent aussi avec le clivage et l’empaquetage de l’ADN viral. AIC246 est inactive sur le CMVM mais en revanche, elle garde un fort pouvoir inhibiteur sur des isolats de CMVH notamment sur les isolats résistants au GCV. Enfin cette molécule inhibe la réplication du CMV dans les cellules humaines dans les modèles d’implants de « gelfoam » chez la souris (Lischka et al., 2010) et elle est actuellement en phase 2 d’essais cliniques et semble pour l’instant être bien tolérée par les patients.

### **4. Inhibiteurs de la protéine kinase UL97**

La protéine UL97 phosphoryle un grand nombre de cibles virales, cellulaires ou exogènes et est importante pour la réplication du virus. En l’absence de son activité enzymatique les effets pléiotropiques observés rendent difficile l’évaluation précise des mécanismes touchés par l’utilisation des inhibiteurs de cette protéine (Prichard, 2009). Les fonctions essentielles bien que non indispensables (Prichard et al., 1999) dans lesquelles intervient la protéine kinase UL97 font de cette molécule une excellente cible pour de nouveaux antiviraux. Plusieurs inhibiteurs ont déjà été identifiés formant une nouvelle classe de molécules antivirales (Biron et al., 2002 ; Herget et Marschall, 2006 ; Mercorelli et al., 2008). Cette classe inclut les indolocarbazoles (Marschall et al., 2001, 2002 ; Zimmermann et al., 2000), les quinazolines (Herget et al., 2004) ainsi que les analogues de benzimidazolés (Biron et al., 2002). A l’exception du maribavir aucun de ces composés n’est arrivé au stade des essais cliniques.

Le Maribavir (MBV) est un benzimidazolé L riboside et est à ce jour la seule molécule inhibitrice hautement spécifique de la kinase UL97 (Biron, 2006). Cette molécule montre des

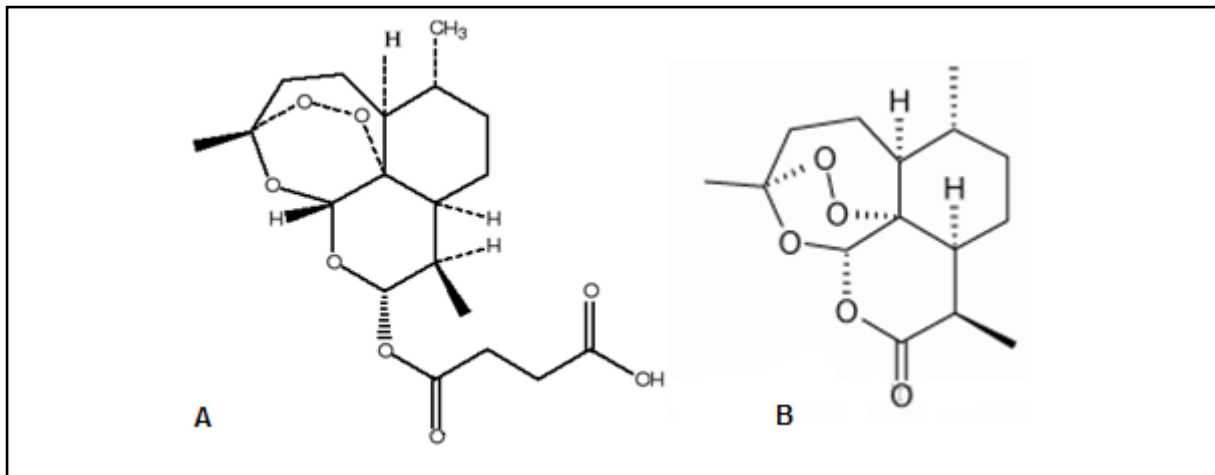
propriétés pharmacocinétiques intéressantes et est bien tolérée, faisant d'elle un excellent candidat comme thérapie anti-CMV (Koszalka et al., 2002 ; Lalezari et al., 2002 ; Ma et al., 2006). L'inhibition de l'activité kinase d'UL97 par le MBV a été établie précocement dans le développement de cette molécule thérapeutique car son action aboutit à l'équivalent du phénotype *UL97 null* (Prichard, 2009 ; Prichard et al., 1999). Et l'étude approfondie de cette molécule a grandement contribué à la compréhension des fonctions d'UL97. Des mutations de résistance apparaissent en laboratoire, après plusieurs passages sur le gène codant UL97. Ces mutations apparaissent de façon particulièrement rapide dans les souches qui sont mutées dans le domaine exonucléasique II de l'ADN polymérase virale (Chou et Marousek, 2008). Elles sont distinctes des mutations de résistance au GCV et certaines sont localisées en dehors des domaines kinases conservés (Chou, 2008 ; Chou et al., 2002, 2007). Ces observations montrent que le MBV reste actif contre les souches résistantes au GCV et laissent penser que cette molécule pourrait être utile dans le traitement des infections à CMV en cas d'émergence de résistances (Biron et al., 2002 ; McSharry et al., 2001 ; Williams et al. ; 2003). Il faut toutefois garder à l'esprit que l'inhibition de l'activité kinase d'UL97 par le MBV va interférer avec l'activation du GCV si ces deux composés se retrouvent utilisées de façon concomitantes (Evers et al., 2002) et ce fait a été démontré en culture cellulaire (Chou et Marousek, 2006). Les études cliniques doivent donc toujours prendre cela en compte, sachant qu'il existe des stratégies en vue de contourner ce problème. De façon intéressante, la plupart des souches résistantes au MBV n'ont pas de mutation dans le gène codant UL97 mais plutôt dans celui codant UL27 (Chou et al., 2004 ; Komazin et al., 2004). La résistance conférée par les mutations dans *UL27* sont plutôt faibles en comparaison de apparaissant dans la kinase. La protéine UL27 joue un rôle dans le blocage du cycle cellulaire (Reitsma et al., 2011) et une délétion du gène *UL27* entraîne la diminution d'un demi-log de la réplication virale *in vitro* sans effet apparent sur la réplication *in vivo* (Prichard et al., 2006). Même si on ne connaît pas encore la façon dont UL27 a un impact sur l'activité du MBV, une des pistes serait qu'elle joue un rôle de modulateur de l'activité d'UL97. Les résultats à l'issue de la phase 3 d'essais cliniques avec le MBV sur les patients traités n'a pas permis de mettre en évidence des résultats à la hauteur des objectifs fixés et le futur de cette molécule en thérapeutique demeure incertain.

## **5. Les médicaments déjà utilisés dans d'autres pathologies comme anti-CMV**

a. Les antipaludéens (Figure 17)

L'artémisinine est la substance active médicamenteuse isolée de la plante armoise annuelle *Artemisia annua*. C'est une lactone sesquiterpénique avec deux atomes d'oxygène liés par un pont peroxyde au-dessus d'un cycle à sept atomes de carbone. Avec sept centres d'asymétrie autorisant un grand nombre de stéréoisomères. Le caractère totalement asymétrique de la molécule d'artémisinine rend sa synthèse artificielle particulièrement difficile, en particulier à des coûts acceptables d'où l'utilisation de dérivés semi-synthétiques comme l'artésunate (Balint, 2001). En mai 2009 deux études indépendantes ont rapporté pour la première fois une augmentation significative de la résistance à l'artémisinine sur le terrain, au Cambodge (Dondorp et al., 2009), probablement en conséquence de pratiques et de traitements incorrects, tel que cela avait été prédit en 2006 par l'OMS. Toutefois, récemment, ces molécules ont trouvé une nouvelle façon de faire parler d'elles, cette fois en tant qu'antiviraux. En effet, leur utilisation comme anti-CMV *in vitro* est efficace, avec une toxicité inférieure aux anti-CMV classiques et de faibles fréquences de mutations. L'artésunate, a prouvé son activité antivirale sur plusieurs lignées cellulaires avec les mêmes effets sur souches naïves ou résistantes au GCV (Efferth et al. 2002). Le mécanisme d'action de cette molécule sur le cycle viral serait lié aux voies de signalisation cellulaires, induisant une diminution du niveau protéique et de la liaison à l'ADN des facteurs de transcription induits par le virus : Sp1 et NfκB. Cette action se ferait notamment via une inhibition de la phosphorylation de deux effecteurs (Akt et p70S6K) en aval de la phosphoinositide-3-kinase qui est nécessaire à l'activation de ces facteurs de transcription (Efferth et al., 2002).

L'artésunate possède en outre un effet additif avec le GCV, le CDV et le PFA (Kaptein et al., 2006). Et son action a été récemment démontrée *in vivo* sur un patient receveur de cellules souches, infecté par une souche de CMV résistante au VGCV (Shapira et al., 2008 ; Lau et al., 2011). Enfin des formes dimériques d'artémisinine ont une meilleure activité antivirale *in vitro* que la forme monomérique et agiraient très précocement en induisant une baisse drastique du niveau d'expression de la protéine IE1 dans les cellules infectées (Arav-Boger et al., 2010).



**Figure 17 : Les deux antipaludéens principaux présentant une activité anti-CMV**

A : Artésunate

B : Artémisinine

#### b. Leflunomide

Le leflunomide est un médicament utilisé dans le traitement des arthralgies rhumatoïdes. Il a été décrit à plusieurs reprises comme un immunosuppresseur et comme un antiviral actif *in vitro* contre le CMVH (Waldman et al., 1999 ; Williams et al., 2002). Il inhibe l'activité des protéines kinases et la synthèse des pyrimidines et il semble être en mesure d'interférer avec l'assemblage des virions néo synthétisés (Waldman et al., 1999). *In vitro* les essais antiviraux montrent une activité aussi bien sur les souches de CMVH sensibles que sur les souches résistantes au GCV et l'utilisation du leflunomide pour soigner quelques patients infectés par une souche multi résistante pour finalement donner des résultats variables (Avery et al., 2004 ; Battiwalla et al., 2007 ; Sudarsanam et al., 2006) et le rôle de ce médicament dans le traitement des infections à CMVH reste encore à déterminer précisément.

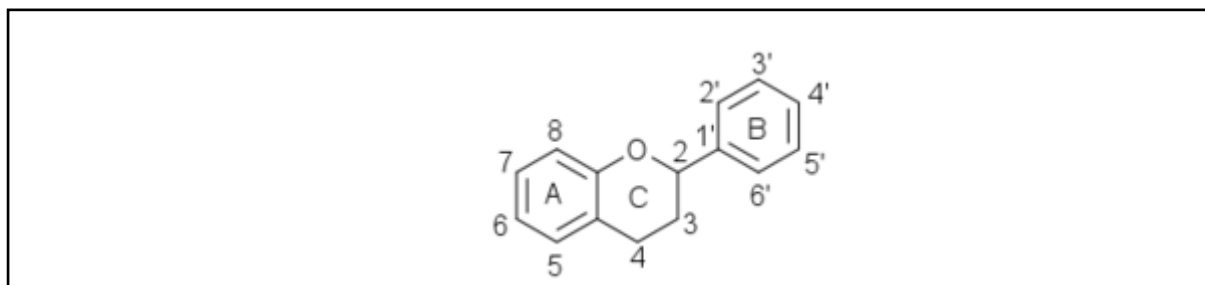
#### c. Sirolimus et everolimus

Des études rapportent que le sirolimus, un immunosuppresseur, ainsi que son dérivé, l'everolimus sont associés à une diminution significative de l'incidence des infections à CMVH chez les receveurs d'organes (Demopoulos et al., 2008 ; Hill et al., 2007 ; Vigano et al., 2009) et chez les receveurs de cellules souches hématopoïétiques (Marty et al., 2007). Un traitement par le sirolimus a même, chez un patient infecté par une souche résistante au GCV,

été associé à une diminution de la charge virale (Ozaki et al., 2007). Les mécanismes d'inhibition ne sont pas encore identifiés mais ces molécules sont connues pour avoir une incidence sur les voies de signalisation et sur la prolifération cellulaire (Johnson et al., 2001 ; Kudchodkar et al., 2004 ; Vigano et al., 2009). Les molécules ayant à la fois une activité immunosuppressive et une activité antivirale seraient à priori d'excellents candidats pour les futurs développements thérapeutiques.

## 6. Autres composés naturels antiviraux, les flavonoïdes

Avec une structure de base commune comprenant deux cycles aromatiques reliés par une chaîne à trois carbones (Figure 18), il existe plus de 5000 flavonoïdes retrouvés à l'état naturel dans les produits d'origine végétale et ces molécules connues pour leurs propriétés anti-oxydantes sont souvent citées comme bénéfiques pour la santé et sont parfois proposées comme compléments alimentaires (Beecher, 2003). On a qualifié ces molécules d'anti-oxydantes, d'anti-inflammatoires, d'antiprolifératives, et de protectrices vasculaires (Gabor, 1986 ; Formica et Regelson, 1995), et leur activité semble pouvoir cibler de nombreuses enzymes cellulaires, notamment certaines pourraient inhiber l'activité de protéines kinases (Middleton et al., 2000).



**Figure 18 : Structure de base des flavonoïdes**

La structure de base comprend deux cycles aromatiques (A et B) et le cycle pyranique (C) pouvant être fermé comme sur la figure ou ouvert

Plusieurs flavonoïdes ont déjà montré un potentiel à inhiber la réplication de certains herpesvirus et du CMV en particulier. La genistéine qui est active contre l'herpesvirus de type 1 bovin (Akula et al., 2002). La 5,6,7-triméthoxyflavone ainsi que le kaempférol inhibent l'HSV, le CMVH, et le poliovirus (Hayashi et al., 1997 ; Amoros et al. 1992 ; Mitrocotsa et al., 2000). La quercétine est active contre le HSV, et le CMVH (Chiang et al., 2003 ; Evers et al., 2005). En raison du grand nombre de cibles que peuvent avoir ces molécules, il est impossible de faire des généralités et chaque composé doit être étudié séparément. Enfin la

faible spécificité de ces molécules rend difficile la sélection d'un candidat pour des études plus poussées et ces molécules ont encore tout à prouver sur leurs propriétés anti-CMV sur les modèles *in vivo*.

## 7. Perspectives vaccinales

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).

### a. 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).

### b. 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).



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.

# Objectifs

Compte tenu de l'inventaire du faible nombre de molécules utilisées en pratique clinique, de la toxicité de ces molécules, de l'impossibilité de traiter la femme enceinte, et de l'étendue des complications qu'elle entraîne, l'infection à CMVH reste à ce jour un problème de premier ordre. L'émergence de mutations de résistance du virus suite à des traitements prolongés par GCV, CDV et PFA partageant la même cible thérapeutique justifie le développement de nouvelles molécules ciblant des étapes différentes du cycle viral.

L'objectif de notre travail de thèse a été d'évaluer le potentiel de nouvelles drogues antivirales, notamment en cas de résistance aux antiviraux classiques et d'établir l'activité, le mode d'action, et la capacité de synergie de nouvelles molécules sur les isolats cliniques de CMV. Afin de permettre l'évaluation de ces drogues chez la femme enceinte, nous avons enfin entrepris la mise en place d'un modèle *in vitro* de l'infection sur cytotrophoblastes puis sur placenta humain. Cette partie du travail se poursuit actuellement au laboratoire avec la thèse d'université de Lucie Morère qui développe le modèle murin de souris SCID humanisées. Nous avons bénéficié de la grande diversité de souches auxquelles nous avons accès via le Centre National de Référence des Cytomégalovirus, ainsi que des outils permettant le génotype et le phénotype de résistance des souches.

Evaluer l'efficacité et la pertinence de nouveaux antiviraux commence par l'évaluation de la résistance aux antiviraux et de l'efficacité des nouvelles molécules sur les souches résistantes. Nous nous sommes intéressés en particulier aux isolats résistants de CMVH à travers deux approches : la surveillance systématique de l'émergence de souches résistantes au sein d'une cohorte multicentrique de patients transplantés et une étude de cas utilisant la technologie des BAC pour étudier l'impact sur la résistance aux molécules thérapeutiques de deux nouvelles mutations de résistance mises en évidence par génotypage sur UL54 chez deux patients, N408S et  $\Delta$ 524 une délétion complète du codon 524.

Nous avons plus particulièrement travaillé sur deux classes de nouveaux antiviraux : les inhibiteurs de la kinase UL97 plus particulièrement leur dérivé indolocarbazole, le maribavir, et les flavonoïdes. Nous avons étudié la protéine UL27, cofacteur potentiel de la kinase UL97 ciblée par le MBV et concerné par l'apparition de mutations subséquentes à l'utilisation de cette molécule en se fixant pour objectif la mise en évidence des relations structure-fonction d'UL97 et du rôle joué par UL27 à partir du polymorphisme naturel de cette dernière et de la modélisation de cette protéine. Dans une deuxième approche nous nous sommes fixés pour objectif de développer un test d'activité kinase de la protéine UL97 non radioactif et facile à mettre en œuvre afin de disposer d'un outil d'étude de l'impact des mutations dans *UL97* et de l'efficacité de certaines molécules à inhiber l'activité de cette protéine kinase virale.

Dans la dernière partie de ce travail nous nous sommes intéressés au potentiel antiviral de nouvelles molécules naturelles d'origine végétale : les flavonoïdes. Cette grande famille de molécules, dont les nombreuses propriétés biologiques sont étroitement dépendantes des sous familles et des composés sélectionnés, a déjà été décrite pour son potentiel antiviral. Nous nous sommes fixés pour objectifs de tester et de caractériser le pouvoir antiviral d'une dizaine de composés en cherchant les relations structure-activité de ces molécules et de développer, au sein du laboratoire, les outils nécessaires à l'étude de nouveau composés, allant de la cytotoxicité et du potentiel antiviral, jusqu'à la mise en évidence des cibles d'action de ces molécules.

# **Etude Expérimentale**

## I. Etude des mutations de résistance d'*UL97* et d'*UL54*

### 1. Surveillance de la résistance du CMV chez les patients transplantés

Ce travail portant sur la recherche de la prévalence des souches résistantes de CMVH aux antiviraux parmi les patients transplantés trouve son origine en 2006 lors de l'obtention d'un PHRC interrégional : « Résistance du cytomegalovirus aux antiviraux après transplantation d'organe et greffe de moelle, à l'ère de la prophylaxie » (investigateur principal : Professeur Sophie Alain).

Les centres de transplantations volontaires qui ont participé à l'étude ont permis d'inclure plus de 800 patients à ce jour. Ces patients sont inclus dès leur première infection active à CMVH (charge virale ou antigénémie positive) et suivis ensuite pendant 3 ans. Quand une résistance clinique est détectée (persistance de la répllication 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 et pour chaque patient inclus, sont recueillis les informations cliniques, thérapeutiques (traitements antiviraux, régime immunosuppresseur) et biologiques nécessaires à l'analyse et à l'interprétation des résultats obtenus.

La première partie de ce travail porte sur l'étude des 443 patients inclus dans le PHRC au niveau de 16 centres (Besançon, Bordeaux, Clermont-Ferrand, Grenoble, Lille, Limoges, Lyon, Nancy, Nantes, Paris, Reims, Rennes, Saint-Etienne, Strasbourg, Toulouse et Tours). Parmi eux 97 ont été exclus en raison de l'absence de prise d'antiviral et parmi les 346 cas restants il y avait résistance clinique au GCV chez 37 patients. 23 de ces patients étaient des receveurs de rein (10,3% des transplantés rénaux), 2 étaient des receveurs de cœur (7,1% des transplantés cardiaques), 3 étaient des receveurs de foie (12,5% des transplantés hépatiques), 5 étaient des receveurs de poumons (71,4% des transplantés pulmonaires) et 4 étaient des receveurs de cellules souches hématopoïétiques (6,8% des receveurs de moelle osseuse).

La présentation clinique à l'inclusion des patients avec ou sans mutation de résistance n'était pas différente et contrairement à ce qui est habituellement décrit comme étant un facteur de risque associé à la survenue de mutations de résistance, la charge virale à l'inclusion était relativement similaire quel que soit le groupe considéré, avec ou sans mutation de résistance (environ 3,6 log<sub>10</sub>).

## **Publication 1**

Etude de la résistance du cytomégalo­virus aux antiviraux chez les patients  
transplantés français à l'ère de la prophylaxie

*Drug-resistant cytomegalovirus in transplant recipients: a French cohort study*

*J Antimicrob Chemother. 2010*

Parmi les 346 patients ayant reçu un traitement antiviral, la moitié présente une non réponse au traitement, définie sur un critère strict (persistance d'une charge virale détectable plus de trois semaines). Parmi ceux-ci des mutations de résistance ont été détectées pour 18 souches de CMVH. Ainsi il a pu être établi une prévalence de résistance de 5,2% toutes greffes d'organes confondues. Ce taux de prévalence de l'émergence de mutations de résistance est inférieur aux 9,5% retrouvés dans des études de cohortes similaires nord-américaines (Lurain et al., 2002). A la différence de notre population, traitée par valganciclovir et ganciclovir I.V., les patients de ces cohortes ont reçu du ganciclovir oral, dont la biodisponibilité médiocre augmentait le risque de sous dosage, et du ganciclovir I.V., et ceci peut être une des explications à ces différences. La répartition par groupe d'organes transplantés reste similaire et le facteur de risque majeur d'émergence de résistance demeure le statut D+/R-. D'un autre côté l'usage d'une prophylaxie, la durée totale du traitement, l'administration d'anticorps anti-lymphocytaires et la charge virale à l'inclusion ne sortent pas dans notre étude comme facteur de risque. Il serait certainement intéressant de prendre en compte d'autres facteurs, comme la durée de l'ADNémie et son intensité (exposition au virus) les traitements immunosuppresseurs, ou l'adéquation des concentrations plasmatiques des antiviraux.

La majorité des mutations de résistance détectées a déjà été décrite dans la littérature, 17 patients parmi les 18 hébergent une souche de CMVH avec une mutation de résistance dans le gène *UL97* et parmi eux, 6 ont des mutations dans les deux gènes *UL97* et *UL54* (Dont 4 mutations de résistance déjà décrites). Ceci représente un pourcentage de 22,5%, supérieur à celui habituellement retrouvé dans les études randomisées (Boivin et al., 2009). Un patient héberge une souche présentant uniquement une mutation de résistance dans *UL54* (A834P) conférant une résistance multiple au GCV, CDV, PFA. Quatre mutations dans *UL54* sont de nouvelles mutations et parmi elles, trois sont responsables d'une substitution d'un acide aminé au sein de sites connus de résistance (D515G, D515Y et S897L). Fait intéressant, si la primo-infection demeure un facteur de risque avéré (OR 8,78% ; IC95% 2,49-30,95) chez les receveurs d'organe, la résistance concerne aussi les receveurs séropositifs, et ceux-ci doivent donc bénéficier de la même vigilance.



## 2. Etude de mutations uniques sur *UL54* par la technologie des BAC

Il est souhaitable de pouvoir disposer d'outils performants permettant à la fois de tester de nouvelles mutations de résistance aux molécules actuellement disponibles sur le marché mais aussi de pouvoir modifier par mutagénèse n'importe quel gène du CMVH et plus particulièrement ceux codant pour les cibles par les nouveaux antiviraux. Cette approche peut être envisagée par l'utilisation de virus recombinants obtenus par la technologie BAC (Bacterial Artificial Chromosome) consistant en l'introduction de l'intégralité du génome du CMVH au sein d'un plasmide transformé dans *E. coli*.

L'identification des souches résistantes associe classiquement l'étude phénotypique de sensibilité aux antiviraux et l'étude génotype de résistance. Ces deux approches étant complémentaires sont toutes les deux pratiquées au laboratoire : elles constituent la première étape indispensable à l'étude des résistances. L'approche phénotypique repose sur la mesure des concentrations d'antiviral inhibant de 50% (CI<sub>50</sub>) la réplication virale. L'approche génotypique consiste à rechercher la présence de mutations par séquençage de l'intégralité des gènes d'intérêt (*UL97* et *UL54*). Cette méthode présente l'avantage d'être réalisable sur l'ADN extrait de la souche virale utilisée pour l'approche phénotypique mais peut également être réalisée directement sur l'ADN extrait du prélèvement du patient, ce qui évite l'étape relativement contraignante et parfois irréalisable de la culture. Le séquençage de l'intégralité des gènes permet également de détecter de nouvelles mutations dont l'implication dans la résistance reste à définir.

Cette approche classique présente toutefois un inconvénient lorsqu'une mutation nouvelle est observée chez un patient résistant. L'appréciation du rôle de cette mutation dans la résistance nécessite un phénotype de résistance sur la souche mutée et le transfert de la résistance à une souche sauvage par recombinaison génétique ou transfert de marqueur. Les gènes *UL97* ou *UL54* porteurs d'une nouvelle mutation, sont préalablement clonés dans un plasmide puis transfectés dans des cellules MRC5 infectées par une souche sauvage AD169. Le gène est inséré au sein du génome par recombinaison homologue. Des essais antiviraux peuvent ensuite être réalisés sur cette souche mutée afin de déterminer le potentiel réel de cette nouvelle mutation. La technique de transfert de marqueur peut également être utilisée pour étudier n'importe quel gène du génome du CMVH en insérant des mutations voire des délétions du gène d'intérêt préalablement cloné dans un plasmide. On peut ainsi étudier le retentissement fonctionnel sur la réplication virale d'un domaine particulier ou de l'intégralité d'un gène. Cependant, cette méthode, qui peut être considérée comme une référence, présente

deux difficultés majeures : le taux de recombinaison homologue *in vitro* chez les herpèsvirus est faible et la sélection des mutants est délicate lorsque la mutation n'implique pas de résistance ou un faible niveau de résistance. Ce type de construction est donc souvent laborieuse et se révèle parfois inefficace du fait des nombreuses modifications additionnelles qui peuvent survenir au cours des manipulations (délétions, réarrangements ou recombinaisons non souhaitées). De plus, le contrôle d'efficacité de recombinaison ne peut être réalisé qu'à l'issue de la technique sur une souche pure obtenue après clonage en dilution limite. Seule une extraction d'ADN viral par la technique de Hirt (Hirt, 1967) suivie d'une amplification et séquençage par PCR du gène cible permet de s'assurer de l'efficacité de la recombinaison homologue. Dans ce contexte, il est indispensable de pouvoir disposer d'une technique plus aisée à utiliser dès qu'une nouvelle mutation est détectée par séquençage et qui permet l'étude d'autres protéines virales impliquées dans le mécanisme d'action des antiviraux actuels et à venir.

Dans cette première étude que nous avons menée avec les BAC, nous nous sommes intéressés à deux mutations retrouvées sur *UL54* lors de génotypages réalisés sur des isolats de patients présentant une résistance antivirale. La mutation  $\Delta 524$  qui est une délétion du codon 524 a été identifiée chez un isolat de patient greffé de rein et traité en prophylaxie par VGCV puis ayant subi un traitement au GCV et une courte cure au PFA. Cette mutation est subséquente à une première mutation détectée au niveau d'*UL97* (M460I). L'autre mutation est une substitution : N408S. Elle a été identifiée chez un patient ayant reçu une greffe de moelle osseuse et traité en prophylaxie par VCV puis ayant reçu deux traitements successifs par VGCV puis par GCV. Cette mutation est sur un site déjà connu pour être à l'origine de résistances (N408K, N408D), mais tout comme  $\Delta 524$ , l'impact de cette mutation sur la résistance antivirale n'était pas encore caractérisé.

## **Publication 2**

Caractérisation de deux nouvelles mutations de résistance du cytomégalo­virus  
humain aux antiviraux à partir de deux isolats cliniques

*Virologic characterization of novel DNA polymerase mutations in human  
cytomegalovirus isolates from 2 transplant patients*  
(En cours de soumission)

Virologic characterization of novel DNA polymerase mutations in human  
cytomegalovirus isolates from 2 transplant patients

S. Hantz\*<sup>1, 2</sup>, S. Cotin\*<sup>2</sup>, E. Borst<sup>3</sup>, A. Salmier<sup>2</sup>, I. Garrigue<sup>4</sup>, P. Merville<sup>5</sup>, C. Mengelle<sup>6</sup>, M. Attal<sup>7</sup>, M. Messerle<sup>3</sup>, S. Alain<sup>1,2</sup>

\*S. Hantz and S. Cotin contributed equally to this study

**Key-words:** Cytomegalovirus, ganciclovir, cidofovir, resistance, transplant recipient

<sup>1</sup> CHU Limoges, Virology department, National Reference Centre of Cytomegaloviruses, Limoges, France.

<sup>2</sup> University of Limoges, Medical School, EA 3175, Limoges, France

<sup>3</sup> Institute of Virology, Hannover Medical School, Hannover, Germany

<sup>4</sup> CHU Bordeaux, Virology department, Bordeaux, France.

<sup>5</sup> CHU Bordeaux, Nephrology department, Bordeaux, France.

<sup>6</sup> CHU Toulouse, Virology department, Toulouse, France.

<sup>7</sup> CHU Toulouse, Haematology department, Toulouse, France.

Corresponding author:

S. ALAIN, MD, PhD

Service de Bactériologie-Virologie-Hygiène

CHRU Dupuytren

2 avenue Martin Luther King

87042 Limoges CEDEX

Tel: 33 5 55 05 61 66/67 24

Mail: [sophie.alain@unilim.fr](mailto:sophie.alain@unilim.fr)

## II. Mutations de résistances au MBV et relations structure-fonction des protéines UL97 et UL27

Parmi les nouveaux antiviraux qui ont été en développement ces dernières années 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*. Le MBV, inhibiteur direct de la kinase UL97, fait partie des molécules qui se sont démarquées ces dix dernières années.

### 1. Importance de la protéine UL27

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). Bien que toutes ces mutations induisent des niveaux de résistance au MBV 5 à 10 fois inférieurs à celui induit par la mutation de résistance L397R identifiée sur UL97, elles ne laissent pas moins penser, par analogie avec les autres protéines cibles des antiviraux, à une implication d'UL27 dans le mécanisme d'action du MBV. Des nouvelles mutations de résistance au MBV ont été générées après plusieurs passages sous pression de sélection par le MBV (Chou, 2009) et la description de très nombreuses mutations tout au long d'*UL27* ainsi qu'une délétion de plus des trois quarts de la protéine (extrémité C-terminale) suggère que UL27 ne serait pas directement impliquée dans le mode d'action du MBV mais pourrait agir indirectement en interaction avec UL97 ou encore être une protéine régulatrice de celle-ci.

A partir de la séquence du gène *UL27* de 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 protéique d'UL27 a été alignée avec celles d'homologues d'autres herpèsvirus humains et animaux et la séquence de 8 souches de CMVH résistantes au GCV 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 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 UL27 peut interagir soit avec UL97 soit avec elle-même. Parmi les 24 isolats, nous avons sélectionné des souches naïves et 8 souches résistantes au ganciclovir portant des mutations de UL97 dans la région IX ou dans le site de fixation de l'ATP en position 460 (région VI). Seul l'isolat résistant, 5004 M460V, muté dans le domaine d'interaction avec l'ATP, porte une mutation T413K, située au sein de l'hélice 386-440 qui pourrait influencer les interactions d'UL27 avec d'autres protéines. Cette mutation est observée naturellement chez l'homologue d'UL27 de HHV7, et n'inactive donc vraisemblablement pas complètement l'interaction.

Bien que la fonction réelle d'UL27 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 d'UL27. 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 d'UL27 et constitue un prérequis pour une analyse ultérieure lorsque la structure en trois dimensions d'un homologue d'UL27 sera disponible.

### **Publication 3**

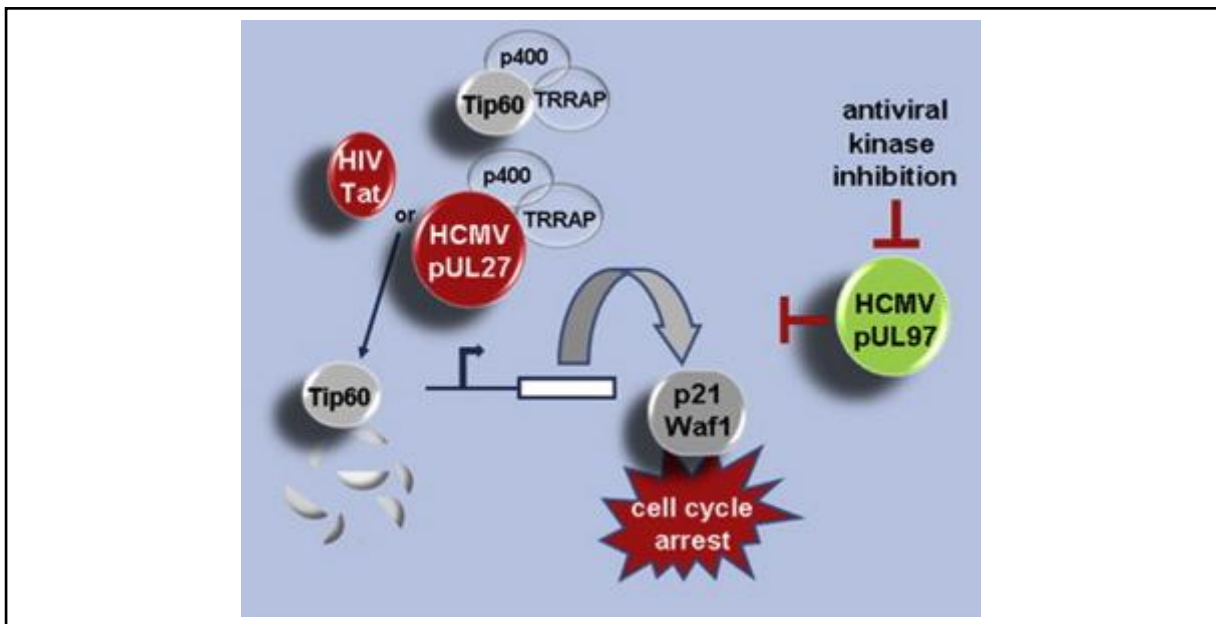
Domaines conservés et prédiction de structure de la protéine pUL27 du  
cytomégalovirus humain

*Conserved domains and structure prediction of human cytomegalovirus*

*UL27 protein*

*Antivir Ther. 2009*

L'hypothèse d'un domaine d'interaction protéine-protéine au sein de la région III d'UL27 que nous avons mis en évidence semble se confirmer par les résultats d'une étude récente (Reitsma et al., 2011) qui montre une interaction directe d'UL27 avec plusieurs protéines cellulaires (Figure 19). En revanche même si rien ne contredit la possible interaction directe entre UL27 et UL97 que nous avons supposée, il semble que le rôle principal de cette protéine soit plutôt lié au blocage du cycle cellulaire. En effet, cette même étude montre une interaction entre UL27 et le complexe acétyltransférase cellulaire Tip60. Cette interaction aboutit à la dégradation de ce complexe conduisant à un blocage du cycle cellulaire. Cette voie serait liée à la régulation de l'expression de p21Waf1/Cip1 dont l'augmentation est déjà connue pour être liée au démarrage de l'expression des gènes IE (Zydek et al., 2010). Enfin UL27 interagirait aussi avec PSME3, un activateur du protéasome, essentiel pour le cycle viral.



**Figure 19** : Modèle d'interaction d'UL27 avec les protéines cellulaires (Reitsma et al., 2011)



## 2. Développement d'un test d'activité kinase dans le cadre de l'étude d'UL97

La kinase ubiquitaire UL97 est une cible potentielle d'antiviraux et notamment du MBV. Cependant son mécanisme d'action est complexe, puisqu'elle agit à de nombreux niveaux du cycle viral et que son activité pourrait être partiellement compensée par les kinases cellulaires dans certaines cellules. Une des raisons de l'incapacité partielle du MBV à inhiber la réplication virale en prophylaxie au cours des études de phase III pourrait dépendre de ces activités compensatoires. Afin de comprendre le mécanisme d'action de la kinase UL97 en présence de ses différents substrats, nous avons mis au point un essai de mesure de l'activité kinase d'UL97 par une technique non radioactive mesurant l'ATP. La possibilité de produire rapidement la protéine sauvage ou mutée doit permettre d'analyser l'effet de mutations sur son activité kinase d'UL97 et sur la phosphorylation du GCV. Dans ce but nous avons travaillé en trois temps, tout d'abord en clonant le gène *UL97* de la souche sauvage de référence AD169 et d'isolats cliniques de patients portant des mutations de résistance connues aux GCV dans un vecteur d'expression. Puis, en introduisant des mutations nouvelles retrouvées chez des patients afin d'étudier leur rôle dans l'acquisition de la résistance. Enfin, en synthétisant *in vitro* la protéine UL97 sauvage ou mutée et en mettant au point un test non radioactif de mesure de l'activité kinase d'UL97 sauvage et mutée présence soit d'histone H2B, soit de ganciclovir.

### a. Matériel et méthode

- Souches de cytomégalovirus

L'ADN de la souche sauvage de référence AD169 a été utilisé pour les expériences de clonage en vue de la production d'UL97 sauvage et pour les expériences de mutagenèse dirigée. Cette souche a été cultivée sur une lignée fibroblastique embryonnaire humaine (MRC5). Après infection ces cellules sont cultivées en milieu MEM complété avec 10 % de sérum de veau fœtal. L'ADN est extrait selon la méthode de Hirt (Hirt, 1967), l'ADN est dosé par mesure de l'absorbance à 260 nm puis conservé à -20°C. Nous avons aussi utilisé de l'ADN de CMV provenant de trois isolats cliniques résistants au GCV et présentant des mutations dans *UL97* (A594G, L595S et  $\Delta$ 599-603).

- Vecteur d'expression eucaryote

Le vecteur utilisé est le pGEM-11Zf(+)/AMV (Ducancelle, 2000) en clonant l'AMV qui est la séquence leader hétérologue appartenant à l'alfalfa mosaic virus dans le vecteur pGEM-11Zf(+) (Promega™). Ce vecteur de 3,2 kb présente un site de clonage multiple de 93 pb situé entre les promoteurs T7 et SP6 de l'ARN polymérase et permet la sélection des clones recombinants sur la base de l' $\alpha$ -complémentation de la  $\beta$ -galactosidase. Ce vecteur a été utilisé à la fois pour la production de la protéine UL97 en lysat de réticulocytes et pour la mutagénèse dirigée.

- Souches bactériennes

Nous avons utilisé les E.coli JM109 qui permettent la réplication du vecteur pGEM-11Zf(+)/AMV. Elles ont un taux de croissance très élevé et préviennent le risque de recombinaison avec l'ADN chromosomique de l'hôte (recA-). Pour la mutagénèse dirigée, nous avons utilisé E.coli BMH 71-18mutS, des bactéries sans système de réparation de l'ADN, ce qui permet d'augmenter l'efficacité de la mutagénèse.

- PCR sur *UL97*

Le gène *UL97* de la souche de référence AD169 ou des isolats cliniques de patients est amplifié avec des amorces contenant des sites de restriction RsRII et HindIII à leur extrémités pour permettre le clonage en aval de la séquence AMV.

UL97 sens : 5' ACGTCGGTCCGTATGTCCTCCGCACTTCGGTCTCG 3'

UL97 antisens : 5' ACGTAAGCTTCCAGCGCGTTTTGACTAAGCCCTCGTG 3'

L'amplification est réalisée à partir de 2  $\mu$ g d'ADN de la souche AD169, dans un volume final de 50  $\mu$ l en présence de 1U de Phusion High-Fidelity DNA polymerase (Finnzymes™), 1X de Phusion GC Buffer, 25  $\mu$ M de chaque amorce, 20  $\mu$ M de dNTP. L'amplification se décompose en une première dénaturation de l'ADN à 98°C pendant 1min, suivie de 30 cycles comportant chacun une dénaturation de 20 sec, une élongation de 1 min 30 sec à 72°C, puis une élongation finale de 5 min. Après migration sur gel d'agarose à 0,8 % avec 0,5  $\mu$ g/ml de bormure d'éthidium en tampon TBE 0,5X, les fragments sont visualisés sous UV, en présence de 5  $\mu$ L du marqueur de poids moléculaire 1 Kb (NEB™).

Les produits de PCR sont purifiés sur mini-colonne avec le Kit Wizard SVgel and clean up system (Promega™). Ce système permet la rétention de l'ADN sur la membrane de silice, suivi de lavages et d'une élution en eau sans nucléase.

- Clonage d'*UL97* dans le vecteur pGEM-11ZF (+)/AMV

Deux microgrammes d'insert et de vecteur sont digérés en présence de 5U de RsrII et 1U de HindIII, dans un volume final de 50 µl pendant 1 h à 37°C. Le vecteur est dephosphorylé pendant 30 min à 37°C en présence de 1U de phosphatase alcaline (NEB™). Les inserts et vecteur sont purifiés sur colonne Wizard SVgel and clean up system (Promega™).

La ligation de l'insert dans 100 ng de vecteur est effectuée pendant 4 h à 16°C par 3UI de T4 Ligase (Promega™). Différents rapports (ADN vecteur/ ADN insert) sont testés pour chaque construction (1/1, 1/3, 3/1).

Après une culture de 18 h de bactéries JM109 dans 5 ml de milieu BHI, 1/100 du volume est remis en culture dans 20 ml de milieu LB. Lorsque la DO se situe entre 0,4 et 0,6, la culture est centrifugée 5 min à 8000 g à 4°C puis remise en suspension dans 20 ml de CaCl<sub>2</sub> froid à 50 mM et incubé 30 min dans la glace. Les cellules sont centrifugées 5 min à 4°C à 8000 g, puis remises en suspension dans 2 ml de CaCl<sub>2</sub>. Les bactéries sont ainsi compétentes et 200 µl sont rajoutées à la totalité du mélange de ligation, le mélange est incubé 20 min dans la glace, soumis à un choc thermique de 45 sec à 42°C et remis à 4°C pendant 2 min. Après addition de 900 µl de milieu BHI, les bactéries sont incubées à 37°C sous agitation (225 rpm) pendant 60 min. Un témoin positif du pouvoir transformant des bactéries JM109 est réalisé en parallèle : 200 µl de cellules compétentes sont transformées avec 0,1 ng de plasmide non coupé puis sont traitées dans les mêmes conditions que précédemment.

La sélection des clones recombinants se fait sur gélose LB contenant 100 µg/ml d'ampicilline, 50 mg/l de XGAL et 100 mM d'IPTG. Les boîtes de gélose sont incubées 16 h à 37°C. La sélection des clones recombinants est basée sur l' $\alpha$ -complémentation de la  $\beta$ -galactosidase et seules les colonies blanches sont utilisées pour réaliser une PCR permettant de vérifier que les bactéries ont été transformées. Elles sont alors remises en culture dans 5 ml de BHI en présence de 100 µg/ml d'ampicilline, sur une nuit à 37°C sous agitation (225 rpm).

Après 16 h à 18 h de culture à 37°C, une extraction plasmidique est réalisée sur le culot bactérien obtenu par centrifugation à 5000 g pendant 15 min à 4°C. Les plasmides sont purifiés à l'aide du kit Nucleospin (Machrey Nagel™), selon les instructions du fournisseur. La quantité d'ADN obtenue est estimée par migration sur gel d'agarose en comparant l'intensité de la bande obtenue à celle du marqueur de poids moléculaire de concentration connue (Smart Ladder) (NEB™).

Les ADN plasmidiques des clones sélectionnés sont séquencés à l'aide d'un automate Abi Prism 3310 et les résultats sont ensuite analysés par le logiciel Sequencing de Applied

Biosystems™. La réaction de séquençage est réalisée avec 500 ng d'ADN plasmidique dénaturé pendant 3 min à 94°C dans un volume final de 11,5 µl contenant 2,5 pmol d'amorce de séquençage, 2,5 µl d'un mélange Big Dye (Applied Biosystems™) dans son tampon 1x final. Le programme de la réaction de séquence comprend 30 cycles de 10 sec de dénaturation à 96°C, 5 sec d'hybridation à 50°C et 4 min d'élongation à 60°C.

- Mutagénèse dirigée

Le kit utilisé afin d'introduire des mutations ponctuelles dans le gène *UL97* est le kit GeneEditor *in vitro* Site-Directed Mutagenesis system (Promega™). Il est basé sur la réalisation d'une double mutagénèse dirigée : introduction d'une mutation dans le gène de résistance à l'ampicilline (gène Amp), déjà présent dans le plasmide, conduisant à un grand niveau de résistance aux β-lactamines et mutagénèse dans le gène *UL97* cloné. La sélection des bactéries qui portent le plasmide avec les deux mutations, est réalisée sur gélose en présence d'un mélange antibiotique sélectionnant les bactéries mutées sur le gène Amp.

La séquence des oligonucléotides de mutagénèse a été choisie à partir de la séquence de la souche de référence AD169. Leur taille est de 23 pb pour les mutations portant sur une seule base mutée et de 29 pour les mutations de deux bases. Leur extrémité 5' est phosphorylée et ils portent une guanine ou une cytidine à leur extrémité 3' pour stabiliser l'appariement des oligonucléotides à l'ADN simple-brin du plasmide. Nous avons choisi d'introduire une mutation connue pour conférer une résistance au GCV en position 460, et une mutation nouvelle en position 510. Deux types d'oligonucléotides de sélection sont fournis dans le kit : le «Top Strand Oligo» et le «Bottom Strand Selection Oligo», qui sont complémentaires de chacun des deux brins du plasmide. Ces oligonucléotides permettent d'introduire une mutation dans le gène de résistance Amp<sup>r</sup>. Nous utiliserons l'oligonucléotide «Bottom Strand Selection Oligo». Le plasmide double brin pGEM-11Zf(+)/AMV contenant le gène *UL97* (0,5 pmol), ainsi que 0,05 pmol du vecteur pGEM-11Zf(+) (témoin) sont dénaturés en présence de 2 µl d'une solution 2 M NaOH, 2 mM EDTA dans un volume final de 20 µl pendant 5 min à température ambiante. L'ADN est ensuite précipité avec 2 µl d'acétate d'ammonium 2 M et 75 µl d'éthanol, à -70°C pendant 30 min. On effectue ensuite une centrifugation de 15 min à 4°C, un lavage avec de l'éthanol à 70 % et une remise en suspension dans un tampon TE (pH 8.0).

Les plasmides dénaturés (0,05 pmol) sont incubés en présence de 0,25 pmol d'oligonucléotide de sélection «Bottom Strand Selection Oligo», de 1,25 pmol d'oligonucléotides de mutagénèse et 2 µl de tampon d'hybridation 1X, dans un bain marie à

75°C pendant 5 min. Les tubes sont ensuite laissés dans le bain-marie éteint jusqu'à ce que la température descende à 37°C. On ajoute alors 5 µl d'eau dans chaque tube, 3 µl de tampon 1X, 5UI de T4 DNA polymérase, 3UI de T4 DNA Ligase qu'on incube 90 min à 37°C.

La transformation est réalisée comme décrit précédemment pour les bactéries JM109 par addition de 1,5 µl de la réaction de mutagénèse à 100 µl de bactéries. Les bactéries sont ensuite transférées dans 4 ml de milieu LB auxquels on aura préalablement ajouté 100 µl de milieu antibiotique de sélection qui permet de sélectionner les cellules exprimant les mutants β-lactamase et remis à 37°C pendant 16 à 18h sous agitation.

Après une extraction plasmidique sur mini-colonne des cultures bactériennes, on effectue une transformation dans des bactéries JM109 afin d'expandre les clones mutés et de stabiliser les mutations introduites. Ces bactéries ont un taux de croissance très élevé et préviennent le risque de recombinaison avec l'ADN chromosomique de l'hôte. La transformation est réalisée avec de 10 ng d'extrait plasmidique dans 100 µl de bactéries. 100 µl de chaque réaction est étalé sur des géloses LB contenant 125 µg/ml d'ampicilline et 100 µl de milieu antibiotique de sélection. Après une incubation de 14 h à 37°C, 8 colonies par boîte sont séquencées après remise en culture dans 5ml de milieu LB contenant 100 µg/ml d'ampicilline à 37°C et sous agitation. Le contrôle positif a été remis en culture sur boîtes de LB contenant 0,5 mM d'IPTG et 80 µg /ml de X-Gal.

Les amorces de mutagénèse utilisées sont (mutations introduites en rouge) :

N510S : 5' CGCGCCGCATCCCC**T**CCTGCTCGCACCGC 3'

M460V : 5' ACATTACACCC**G**TGAACGTGCTC 3'

- PCR assemblage

La technique de PCR assemblage consiste à fusionner deux fragments individuels d'ADN obtenus par amplification génique, de telle sorte que l'extrémité 3' du premier fragment soit complémentaire sur quelque nucléotide de l'extrémité 5' du second, et vice versa. Cette technique va nous permettre d'induire une délétion de 9 bases à l'intérieur du gène *UL97* en position 596-599. Deux amorces externes contenant les sites de restriction *RsrII* et *HindIII* permettant d'amplifier le gène *UL97* et deux amorces internes se chevauchant et ne portant pas la partie délétée.

Deux premières PCR sont réalisées à l'aide d'une amorce externe et une amorce interne dans un volume final de 50 µl contenant 2 µg d'ADN viral, 1U de Phusion High-Fidelity DNA polymerase (Finnzymes™), 1X de Phusion GC Buffer, 25 µM d'amorce, 20 µM de dNTP. L'amplification commence par une dénaturation de 1 min à 98°C, suivie de 30 cycles

comportant une dénaturation de l'ADN à 98°C pendant 10 sec, une hybridation de 20 sec à 77°C et une élongation de 1 min à 72°C, et se termine par une élongation de 5 min à 72°C. Les produits de cette première amplification sont purifiés et utilisés comme matrice pour la PCR secondaire (PCR assemblage) avec les amorces externes situées de part et d'autre du gène *UL97*. Dans un volume final de 50 µl contenant 1X de Herculase II reaction buffer, 15 mM de dNTP, 50 ng du produit de chaque PCR, 15 µM de chaque amorce, 2 µl de DMSO et 1 µl d'enzyme Herculase II fusion DNA polymérase (Agilent Technologies™). L'amplification commence par une dénaturation de 1 min à 98°C, suivie de 30 cycles comportant : une dénaturation de l'ADN à 98°C pendant 10 sec, une hybridation de 20 sec à 68°C et une élongation de 1 min à 72°C et se termine par une élongation de 5 min à 72°C. S'en suit une étape de purification sur gel afin d'éliminer les bandes aspécifiques. Pour finir nous avons cloné les gènes mutants obtenus de la même manière que pour *UL97* non muté.

Les amorces utilisées pour la PCR assemblage sont :

596-599 S : 5'GCGCGGCCTGCCGCGCGTTGCTCACGCACTGCTCCGACGCCTGT 3'

596-599AS: 5'GCGTCGGAGCAGTGCGTGAGCAACGCGCGGCAGGCCGCGCCGGC 3'

- Expression protéique *in vitro*

Nous avons choisi le système de traduction-transcription couplées *in vitro* (Systeme TNT, Promega™) pour la production de la protéine kinase *UL97* car celui-ci, utilise directement des constructions plasmidiques contenant les promoteurs T7, SP6 ou T3 et se fait en une seule étape.

La production protéique est vérifiée grâce à l'utilisation du «Transcend® Non-Radioactive Translation Détection Systems» (Promega™), qui consiste en l'ajout du composé tRNA portant une lysine biotinyllée, qui est incorporée lors de la synthèse protéique et la présence cette lysine est révélée par chimioluminescence à l'aide de la stréptavidine peroxydase fournie dans le kit. Le mélange réactionnel (volume final 50 µl) contient 40 µl de TNT® Quick Master Mix, 2 µl de Méthionine, 1 µg de plasmide et 2 µl de tRNA. La synthèse de la luciférase est réalisée en parallèle comme contrôle positif de la réaction. Un témoin négatif (T-) est également réalisé qui est le lysat de réticulocytes sans ajout de plasmide. La production est réalisée à 30°C pendant 2 h.

- Révélation de la synthèse protéique

La dénaturation des protéines a été réalisée à partir de 2 µl ou 10 µl de la production réalisée. Pour les 2 µl, nous avons ajouté 10 µl de SDS 10X et nous avons chauffé le tout

pendant 15 min à 70°C. Pour les 10 µl, nous les avons précipités dans 40 µl d'acétone puis incubés 15 min dans la glace et centrifugés 5 min à 12000 g avant remise en suspension dans 5 µl d'H<sub>2</sub>O et 10 µl de SDS, le tout étant chauffé pendant 5 min à 94°C.

La totalité des protéines dénaturées est déposée et séparée par SDS-PAGE en gel d'acrylamide 8 % en présence de 10 µl de marqueur de poids moléculaire «ColorPlus Prestained Protein Marker» (NEB™) pendant 90 min à 130 V.

La migration est suivie d'un électro-transfert sur membrane de PVDF (polyvinylidene difluoride), pendant 75 min à 13 V.

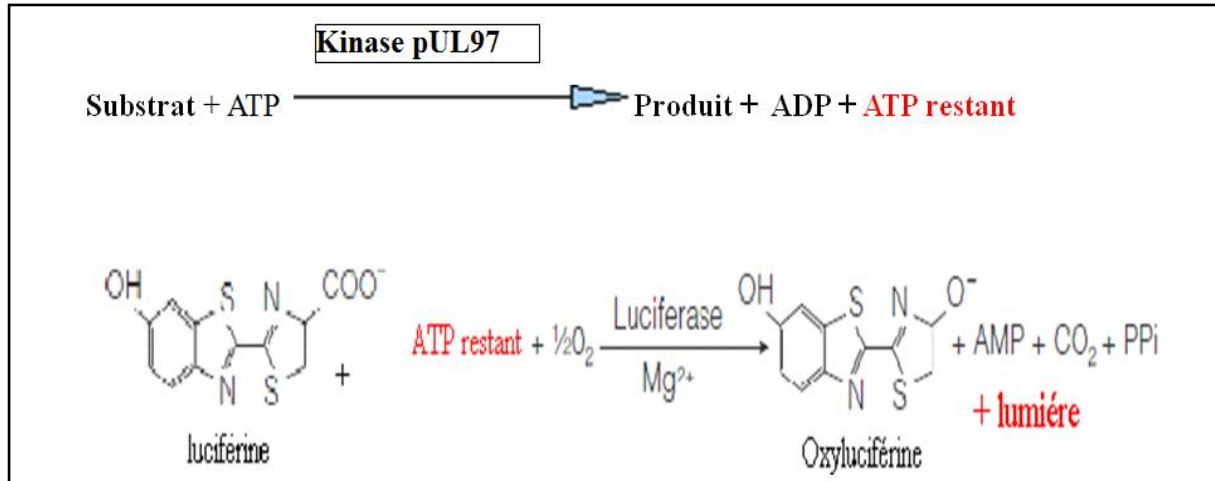
Après électrotransfert, les protéines biotinyllées sont visualisées en chimioluminescence par l'utilisation du système streptavidine-peroxydase. La membrane est d'abord saturée 1 h sous agitation douce avec 15 ml de tampon TBS (tris-HCL 20 mM ph 7,5, NaCl 150 mM) contenant 0,5 % de tween 20 (TBST). Elle est ensuite incubée en présence du conjugué streptavidine marqué à la peroxydase (dilution 1/75000 en TBST), pendant 50 min en agitation. Après 3 lavages de 5 min en TBST et 3 lavages de 5 min en H<sub>2</sub>O, le substrat chimioluminescent est rajouté dans l'obscurité et incubé pendant 1 min. La membrane est ensuite placée dans un film transparent et exposée entre 2 et 5 min dans une cassette en présence d'un film autoradiographique et révélé par un automate.

- Mesure de l'activité de la protéine kinase UL97

Afin de mesurer la capacité des protéines produites en lysat de réticulocytes à phosphoryler le ganciclovir, nous avons utilisé le Kinase-Glo® Luminescent Kinase Assay Platform. Ce test peut être réalisé en absence de produits radioactifs et est basé sur les propriétés de la luciférase à générer un signal lumineux qui possède une demi vie supérieure à 5 h. Ce signal lumineux est émis par utilisation de l'ATP restant à la fin de la réaction de kinase qui consiste en l'incubation de la protéine UL97 sauvage ou mutée en présence de substrat, GCV ou histone H2B (Roche Molecular™, Meylan, France) pour catalyser la mono-oxygénation de la luciférine. Cette réaction émet un signal lumineux qui est inversement proportionnel à l'activité de la kinase UL97. Plus la protéine est active et moins il restera d'ATP à la fin de la réaction de kinase pour être utilisé par la luciférase, et moins de lumière sera émise et mesurée. (Figure 20).

La réaction est réalisée en présence de 20 µl de protéine produite en lysat de réticulocytes, 5 µl de tampon contenant l'ATP (50 mM tris Hcl PH 9,0, 300 mM NaCl, 10 mM MgCl<sub>2</sub>, 2 mM DTT et 10 µM ATP), 10 µM de GCV ou 5 µg d'histone H<sub>2</sub>B (NEB™) et dans un volume final 50 µl. Les tubes sont incubés pendant 1 h à 37°C puis ramenés à température

ambiante, pour y ajoute 50 µl du Kinase-Glo® Reagent qui est le mélange du Kinase-Glo® Substrate et du Kinase-Glo® Buffer. Le Mélange est incubé 10 min à température ambiante puis la luminescence est mesurée dans des plaques 96 puits par un luminomètre.



**Figure 20 : Réaction chimique du test d'activité kinase**

L'ATP restant à la fin de la réaction de kinase est utilisé par la Luciférase pour catalyser la mono-oxygénation de la luciférine, qui produit la lumière. La luminescence est inversement proportionnelle à l'activité kinase.

Nous avons utilisé deux témoins : un témoin négatif dans lequel a été ajouté le témoin négatif de production ne contenant pas le plasmide d'intérêt et un témoin ne contenant pas le substrat (GCV et H2B) afin d'estimer l'autophosphorylation de la kinase.

## b. Résultats

- Clonage d'*UL97* dans pGEM11-Zf(+)/AMV (Figure 21)

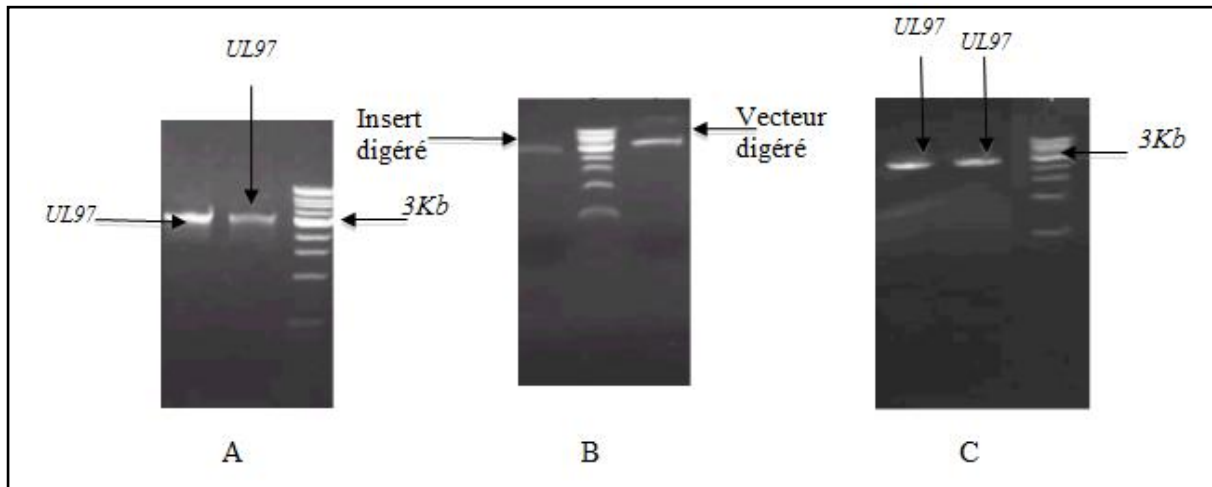
Les fragments d'intérêt ont été amplifiés par PCR et une migration sur gel d'agarose a permis de vérifier que le fragment amplifié était bien à la taille attendue de 2760 pb contenant la partie codante du gène *UL97* de (2124 pb) ainsi que le polyA du gène.

La ligation des inserts et du vecteur a été réalisée selon différents rapports (1/1, 1/3, 3/1) et après transformation, nous avons observé 3 fois plus de recombinants dans le rapport 3/1, ce qui traduit une meilleure efficacité de ligation avec ce rapport.

La PCR de criblage a montré que 9 clones sur 10 testés avaient une seule bande à la taille attendue (2760 pb). Le séquençage des fragments amplifiés a permis de vérifier le respect du cadre de lecture et la présence d'une mutation pour les clones ayant intégré *UL97* muté et



nous avons ainsi obtenu les produits nous permettant d'exprimer in vitro UL97 native ou mutée.



**Figure 21 : Clonage d'UL97 dans pGEM11-Zf(+)/AMV**

Migration sur gel 0,8 % en tampon TBE en présence d'un marqueur de taille (1Kb) des produits de PCR d'UL97 (A), des vecteurs et inserts digérés (B), des produits de PCR de criblage en présence du marqueur de taille et de concentration (Smart Ladder®) (C)

- Obtention des mutants
  - Mutations ponctuelles

N'ayant pu obtenir d'isolats cliniques de patients portant les mutations M460V et N510S, nous avons utilisé la mutagenèse dirigée afin d'introduire ces mutations dans le gène *UL97*. La première étape est la dénaturation du plasmide contenant le gène codant *UL97* sauvage. La figure 22 montre que la dénaturation est complète. En effet, on observe après migration sur gel, deux bandes de taille inférieure à celle du plasmide natif correspondant au plasmide simple brin dénaturé (comme indiqué sur les recommandations du fournisseur) et au plasmide coupé sur un brin dénaturé. La température d'hybridation des oligonucléotides de mutagenèse et de sélection est de 75°C dans les conditions standards de la réaction, mais doit tenir compte de la composition en bases de l'oligonucléotide de mutagenèse. A 75°C, seul l'oligonucléotide qui nous sert de témoin positif a permis d'obtenir des clones. L'efficacité de la transformation et de la mutagenèse dirigée a été contrôlée avec le plasmide contrôle et les oligonucléotides adéquats. Comme attendu, nous avons retrouvé plus de 60% de colonies blanches pour chaque essai de mutagenèse.

Pour les deux oligonucléotides portant les mutations à introduire dans le gène *UL97*, une adaptation au Tm des oligonucléotides de mutagenèse a donc été nécessaire. Les mutants ont

été obtenus pour une température d'hybridation de 69°C pour l'oligonucléotide portant la mutation en position 460, et de 94°C pour l'oligonucléotide portant la mutation en position 510.

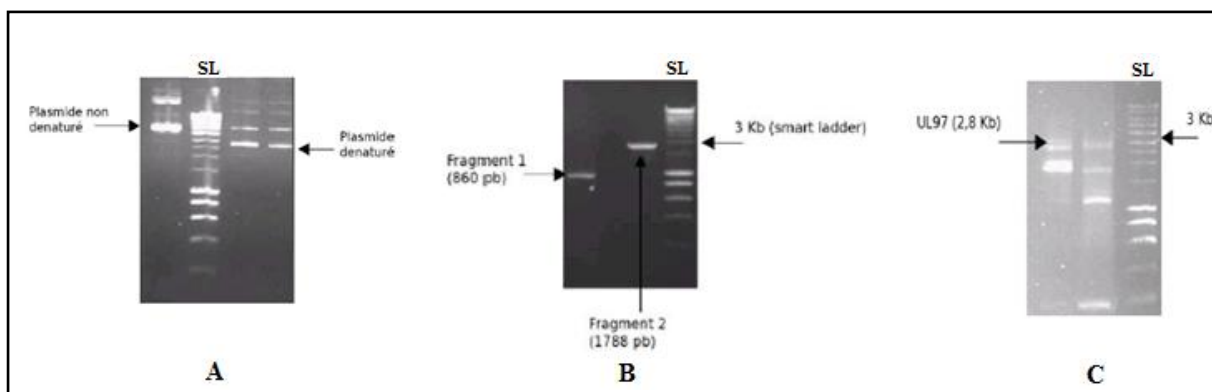
Des clones recombinants portant la mutation désirée ont été obtenus pour chacune des mutations introduites par mutagenèse dirigée. La présence effective des mutations est vérifiée par séquençage. Nous avons ainsi obtenu les plasmides possédant le gène codant les protéines UL97 mutées M460V et N510S.

#### - Délétion

Afin d'introduire la délétion nouvelle se trouvant en position 596-599, nous avons utilisé la PCR assemblage car cela n'est pas possible par mutagenèse dirigée.

L'amplification des deux fragments entourant la délétion a été vérifiée après migration par la présence de deux bandes à la taille attendue (1788 et 860 pb respectivement), les bandes visualisables sur la figure 22 correspondent aux tailles attendues. Par la suite une PCR permettant d'amplifier la totalité du fragment correspondant à la totalité du gène *UL97* a été réalisée.

Après clonage, le séquençage des gènes *UL97* des clones obtenus a confirmé la présence de la délétion à l'emplacement attendu et nous a permis d'obtenir le plasmide pGEM-11Zf/AMV contenant le gène *UL97* pourtant la délétion 596-599 ( $\Delta$ 596-599).



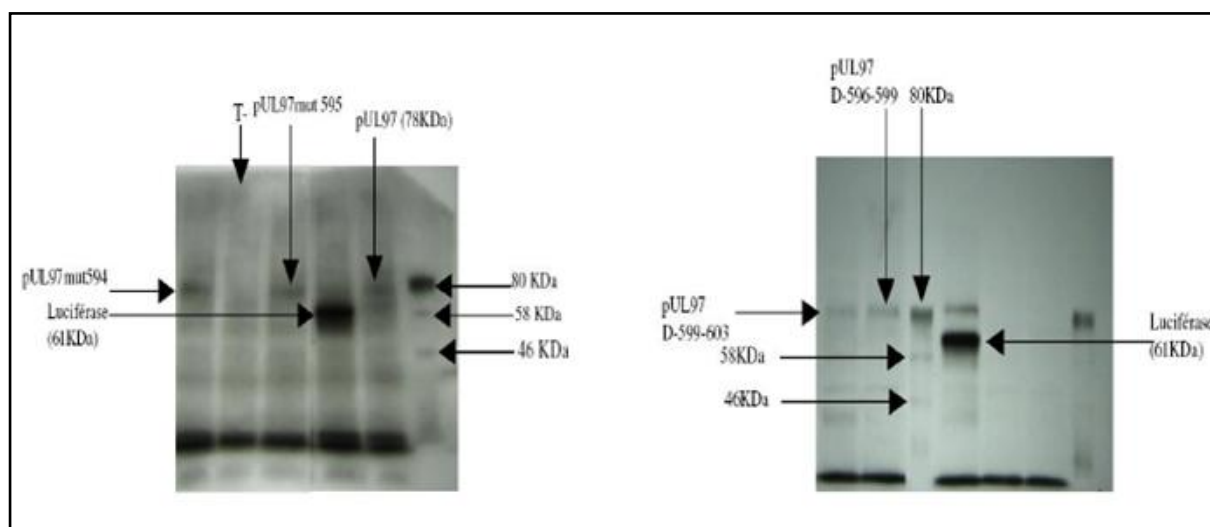
**Figure 22 : Mutagenèse sur *UL97***

Migration sur gel 0,8 % en tampon TBE en présence du marqueur de poids moléculaire Smart Ladder® (SL) des plasmides avant et après dénaturation (A), des produits de PCR à l'issue de la première étape de l'expérience de PCR assemblage (B), du produit final de la PCR assemblage (C)

- Transcription et traduction couplée *in vitro*

La synthèse de la protéine kinase UL97 a été réalisée à partir des plasmides contenant les gènes *UL97*, *UL97mut594*, *UL97mut595*, *UL97Δ569-599*, *UL97Δ599-603*. La production des protéines a été vérifiée par chimioluminescence grâce à l'incorporation de lysine biotinylée au cours de la synthèse protéique. L'utilisation de ce système de révélation est possible grâce à la présence de 11 lysines dans la protéine UL97.

Une bande a été observée pour tous les clones utilisés à la taille attendue (78 KDa) et celle-ci est absente du contrôle négatif dans lequel le plasmide est absent, ceci montre que cette bande correspond bien à notre protéine (Figure 23). Deux gels différents sont réalisés pour chaque production : un sur lequel sont déposées 2 µl du mélange de production et un autre avec 10 µl de ce même mélange pour pouvoir visualiser la production protéique si celle-ci est trop faible. Quand 10 µl de produit sont déposés le bruit de fond est très élevé et les résultats sont impossibles à interpréter ce qui n'est pas le cas avec 2 µl. La luciférase qui nous a servi de contrôle positif a aussi été produite à la taille attendue (61KDa). Enfin, les bandes surnuméraires observées sur toutes les pistes correspondent à des protéines présentes dans le lysat de réticulocytes parmi lesquelles la globine.



**Figure 23 : Révélation en Western Blot de la production d'UL97**

La luciférase sert de protéine de référence. La révélation est effectuée en streptavidine couplée à la peroxydase par chimioluminescence grâce à l'incorporation de lysines biotinylées dans les protéines synthétisées.

- Test d'activité de la protéine kinase UL97

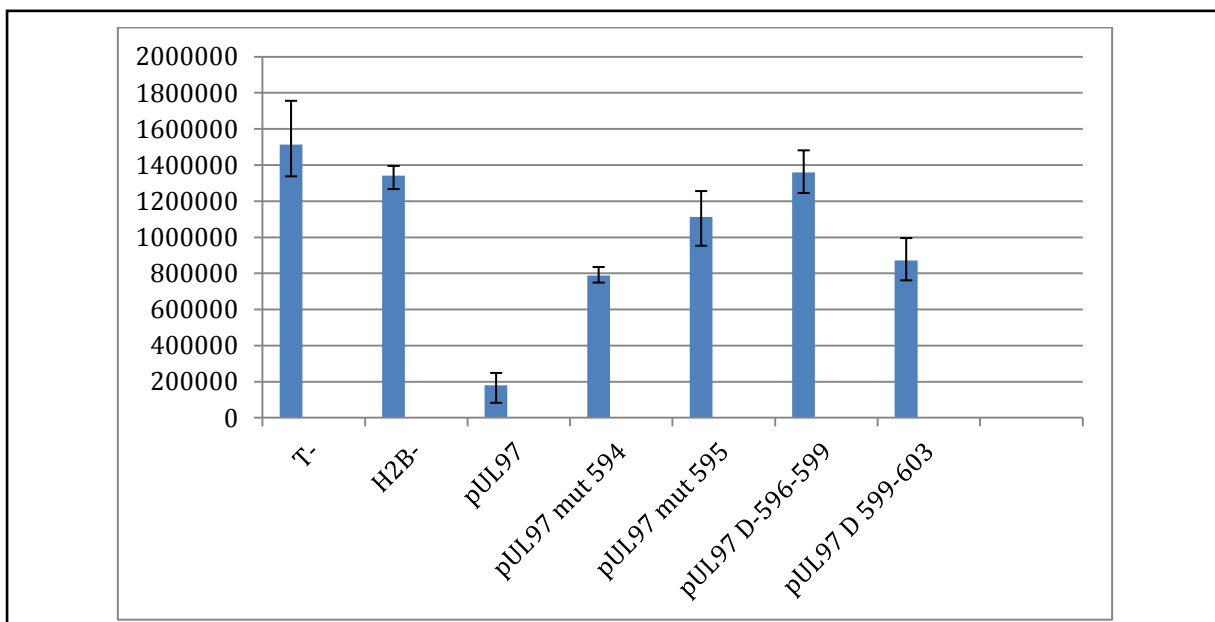
- Activité des protéines UL97 native et mutées

Les protéines sont testées en présence d'un substrat cellulaire, l'histone H2B, afin d'analyser l'effet des mutations sur la fonction kinase de cette protéine et donc sa capacité à phosphoryler ses substrats naturels.

L'expérience est menée en présence de la protéine UL97 native ou mutée, d'ATP et du Kinase-Glo® Reagent et les résultats montrent que la protéine produite en lysat de réticulocytes est active (Figure 24). On observe une phosphorylation très élevée de l'histone H<sub>2</sub>B par la protéine UL97 de la souche de référence AD169, reflétée par une luminescence très basse ne représentant que 11% de la luminescence émise par le témoin ne contenant pas l'histone H2B.

La valeur moyenne de la luminescence mesurée pour le témoin contenant du lysat de réticulocytes sans le plasmide (T-) est 12% plus élevée que celle du témoin sans histone H2B. Cette différence pouvant correspondre à l'autophosphorylation de la protéine UL97.

Les mutants mut594, mut595 et les clones portant les délétions  $\Delta$ 599-603 et  $\Delta$ 596-599 ont une activité réduite, avec respectivement 22%, 16%, 13% et 20% d'activité par rapport à la protéine kinase de la souche de référence AD169.



**Figure 24 : Phosphorylation de l'histone H<sub>2</sub>B par UL97 native ou mutée**

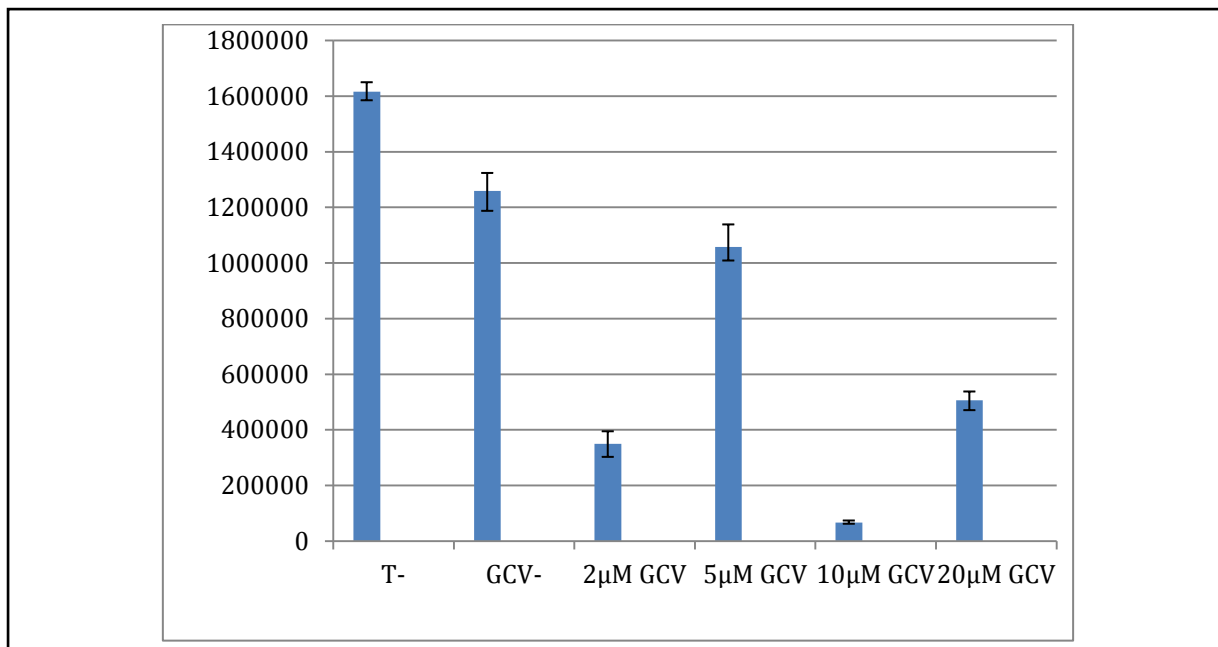
T- : Lysat de réticulocytes sans plasmide, H<sub>2</sub>B- : UL97 en présence d'ATP mais sans H2B

#### - Phosphorylation du GCV

La concentration optimale de ganciclovir à ajouter à la réaction a d'abord été déterminée en mettant la protéine UL97 sauvage en présence de différentes concentrations de GCV et en estimant sa phosphorylation. Pour cela, quatre concentrations de GCV ont été testées : 2  $\mu$ M,

5  $\mu\text{M}$ , 10  $\mu\text{M}$  et 20  $\mu\text{M}$  et nous avons trouvé que la concentration optimale pour mener ces expériences est de 10  $\mu\text{M}$  (Figure 25), ce qui correspond aussi à la concentration moyenne utilisée dans des tests d'activité kinase en présence d'ATP radioactive, retrouvés dans la littérature (Marschall et al., 2001).

Le témoin négatif correspond à une production en lysat de réticulocytes en absence de plasmide pour lequel la luminescence mesurée est très élevée, ce qui reflète une absence d'activité kinase. L'autre témoin permet de vérifier l'activité de la protéine en absence de substrat, révélant ainsi l'autophosphorylation d'UL97. La luminescence émise par ce témoin est de 25% inférieure au témoin négatif. Il existe donc bien une autophosphorylation de la protéine.



**Figure 25 : Détermination de la concentration de GCV à utiliser**

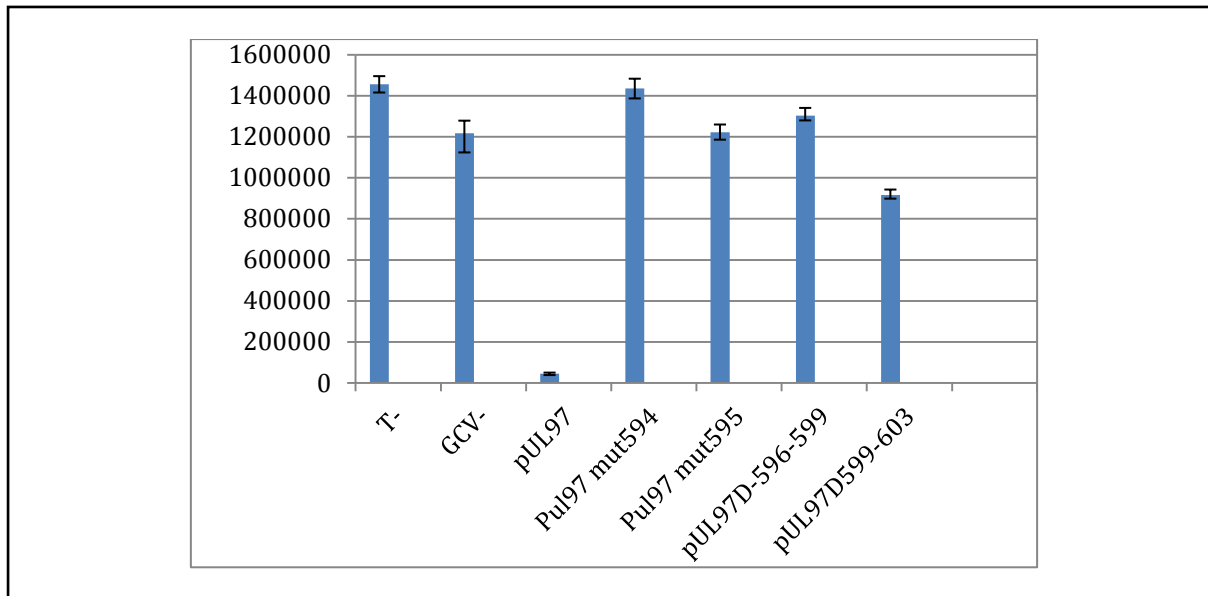
T- : Lysat de réticulocytes sans UL97, GCV- : UL97 en absence de GCV

Les tests sur les mutants ont été réalisés en présence de 10  $\mu\text{M}$  de GCV afin d'évaluer la capacité d'UL97 sauvage ou mutée à phosphoryler ce substrat.

Les résultats obtenus montrent qu'en présence de la protéine sauvage UL97 et de GCV la luminescence mesurée est très faible comparée à celle mesurée pour le témoin négatif (3%). Cela traduit une forte activité kinase et à une consommation élevée de l'ATP présent dans la réaction pour phosphoryler le GCV.

La luminescence du témoin négatif (T-) est de 17% supérieure à celle du témoin ne contenant pas de substrat (GCV-), ce qui correspond à l'autophosphorylation de pUL97.

Les mutants mut594, mut595,  $\Delta$ 599-603 et  $\Delta$ 596-599 ont une activité très réduite comparés à la protéine UL97 sauvage avec respectivement 3%, 3,6%, 3,5% et 5%. Ces mutations et délétions sont donc associées à une perte de la capacité de la kinase à phosphoryler le GCV (Figure 26).



**Figure 26 : Phosphorylation du GCV par UL97 native ou mutée**

T- : Lysat de réticulocytes sans plasmide, GCV- : UL97 en présence d'ATP mais sans GCV

La reproductibilité des résultats obtenus avec l'histone H2B et le GCV a été vérifiée en testant chaque condition en triplicate et on observe un écart non significatif entre les différents résultats obtenus. De plus les tests d'activité ont été réalisés à partir d'un pool des productions en lysat de réticulocytes pour la protéine native et les protéines mutées et on a pu constater une bonne reproductibilité des résultats.

La différence de quantité de protéines natives ou mutées a été prise en considération dans les tests d'activité. En effet, la comparaison de l'intensité des bandes (Figure 23) montre que la quantité d'UL97 sauvage produite est plus faible que celle des mutants ce qui vient encore renforcer la différence obtenue.

### c. Discussion

La connaissance des mutations conférant au CMVH une résistance aux antiviraux est nécessaire afin d'analyser les mécanismes moléculaires de la résistance et mieux connaître les relations structure fonction de la protéine kinase UL97 virale. Cette protéine est essentielle au cycle viral (Michel et al., 1998) et est capable de phosphoryler un grand nombre de substrats

cellulaires, viraux ou exogènes (Prichard, 2009). Elle constitue une cible potentielle de nouveaux antiviraux (Gershburg et al., 2004) et une meilleure connaissance des relations structure-fonction de cette protéine est importante pour le développement de nouvelles molécules.

La mutagenèse dirigée et la PCR assemblage nous ont permis de reproduire *in vitro* des mutations et les délétions localisées sur le gène de la protéine kinase précédemment décrites suite à des géotypages d'isolats cliniques. La production *in vitro* d'une protéine est la méthode de choix pour établir une corrélation directe entre la protéine produite et la séquence du gène utilisé et pour étudier son activité enzymatique. Les systèmes de traduction *in vitro* sont multiples, soit de type procaryote, soit de type eucaryote tel que le système en lysat de réticulocytes que nous avons utilisé. *In vivo*, les réticulocytes ont pour rôle la synthèse de l'hémoglobine, qui représente 90% des protéines produites dans les réticulocytes. Ces cellules n'ont pas de noyau mais contiennent l'ARN ribosomique et l'ARN de transfert nécessaires à la synthèse de l'hémoglobine. Afin de les utiliser pour la production d'autres protéines il faut retirer les ARNm codant l'hémoglobine. Les ribosomes sont plus résistants car engagés dans les structures ribonucléoprotéiques. Ensuite les ARNt sont ajoutés. Nous avons choisi le système de traduction-transcription couplées *in vitro* (Systeme TNT®, Promega™) pour la production de la protéine kinase UL97 car celui-ci, utilise directement des constructions plasmidiques contenant les promoteurs T7 et tout peut se faire en une seule étape. La production de protéines en lysat de réticulocytes présente un autre avantage qui est d'apporter des modifications post-traductionnelles à la protéine produite telles que l'acétylation, l'isoprenylation et la phosphorylation, cette dernière étant indispensable à l'activation de la protéine UL97.

Dans un premier temps, nous avons cloné le gène *UL97* de la souche de référence AD169 car son génome a été séquencé en totalité et est disponible dans les banques de données et elle ne porte pas de mutations de résistance aux antiviraux. Bien que cette souche soit une souche de référence déléetée de certains gènes intervenant dans le pouvoir pathogène, la protéine UL97 est identique à celle des isolats cliniques. Ce gène a été cloné dans le vecteur d'expression pGEM-11Zf(+)/AMV qui permet la sélection des clones recombinants sur la base de l' $\alpha$ -complémentation de la  $\beta$ -galactosidase, la transcription *in vitro* à partir des promoteurs T7, et sert de support à la mutagenèse dirigée. Le choix du promoteur qui dirige la transcription (T7 ou SP6) influe sur l'efficacité de la traduction ultérieure dans le système de production en lysat de réticulocytes (Jabs et al., 1998). Le promoteur T7 a été utilisé car permettant un niveau de traduction plus élevée. Les régions non codantes en amont du site

d'initiation de la traduction jouent un rôle important dans l'efficacité de la traduction *in vivo* et *in vitro* (Jobling et al., 1987). De fait, il a été montré que la substitution de la région riche en G-C en amont du site d'initiation de la polymérase UL54 par la séquence leader riche en A-T de l'alfalfa mosaic virus (AMV) augmente l'expression de la protéine sans en modifier les caractéristiques fonctionnelles (Ducancelle, 2000). Nous avons donc utilisé le vecteur pGEM-11Zf (+) dans lequel a été clonée cette séquence en totalité en amont du site d'initiation du gène. La région non codante qui inclut les sites de polyadénylation joue aussi un rôle important dans la stabilité des ARN messagers dans les systèmes eucaryotes. L'addition du site de polyadénylation augmente l'expression de la luciférase *in vitro* de 97 fois (Tanguay et Gallie, 1996) et de premiers essais de production d'UL97 au laboratoire en l'absence du site de polyadénylation n'avaient pas permis d'obtenir une production protéique détectable, c'est pourquoi nous avons construit un plasmide portant la région 3' non codante de 640 paires de bases contenant le site de polyadénylation avec lequel nous avons obtenu une production.

La quantité de protéines attendue produites en lysat de réticulocytes est dans les conditions optimales de 300 ng pour un volume final de 50 µl d'après le fabricant. L'intensité des bandes obtenues sur autoradiographie suggère que la quantité de protéines produites pour chacun des mutants est effective et ne varie que très faiblement dans des conditions expérimentales standardisées. En effet, la quantité d'ADN plasmidique introduite dans la réaction de transcription/traduction à partir de chaque construction est constante (1 µg), et un volume identique (20 µl) de cette réaction est utilisé pour la mesure de l'activité enzymatique. De plus, la production des protéines est vérifiée à chaque fois par western-blot. Finalement, ce protocole associant production de protéines en lysat de réticulocytes et western-blot rend notre système performant pour synthétiser UL97 *in vitro* et en étudier l'activité, de surcroît ce système est rapide puisque 3 h suffisent pour obtenir une quantité suffisante de protéine et en étudier l'activité kinase.

Un facteur limitant pour détecter la production est la quantité de lysines présentes dans la protéine. UL97 contient 1,5% de lysines au lieu des 5% nécessaires pour une détection optimale et il a donc été nécessaire d'augmenter la quantité d'ARNt utilisée pour pouvoir observer l'efficacité de la production de notre protéine.

Les résultats obtenus dans les tests d'activité kinase réalisés montrent que la perte de la capacité de phosphorylation du GCV par UL97 s'accompagne d'une perte de phosphorylation de l'histone H2B, ce qui est en contradiction avec ce qui est observé *in vivo*. En effet, chez les patients présentant une résistance au GCV suite à une mutation d'UL97, le virus continue à se répliquer. Sachant que cette kinase est indispensable à la répllication virale,



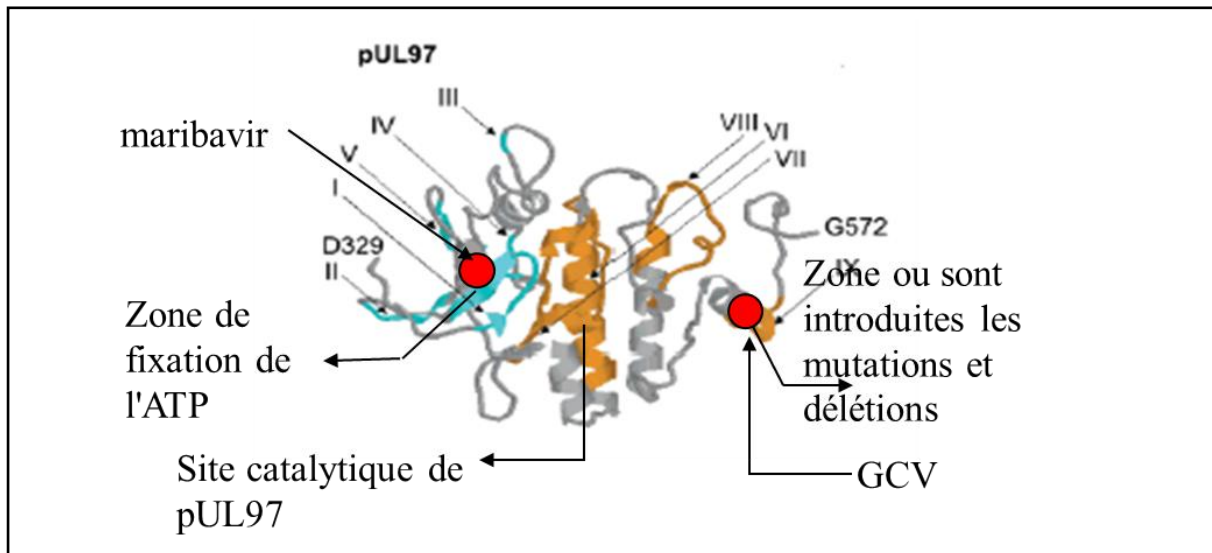
on peut déduire que la résistance au GCV n'influe pas sur son rôle dans la réplication virale par phosphorylation de substrats viraux et cellulaires. Plusieurs hypothèses pourraient expliquer les résultats obtenus : Il est possible que la résistance au GCV s'accompagne d'une perte de phosphorylation des certains substrats d'UL97, comme l'histone H2B sans que cette perte ne soit totale et qu'elle garde une activité suffisante sur les autres substrats pour assurer ses fonctions. Dans ce cas, il est nécessaire de développer des inhibiteurs puissants capables d'induire une perte totale d'activité de la protéine, ce qui est cas du maribavir.

Une prédiction de la structure tridimensionnelle de la protéine a été réalisée pour UL97 par homologie avec la structure de la kinase cdk2 (Figure 27) (Romaker et al., 2006). Sur cette structure est représenté le site catalytique de la protéine (domaine VI) où se fixent les substrats naturels d'UL97 tel que l'histone H<sub>2</sub>B. En bleu est représenté le site de fixation de l'ATP et le domaine IX où se trouve la région de résistance au GCV. Les mutations que nous avons étudié se trouvent dans le domaine IX et sont à distance du site catalytique de la protéine où va se fixer le substrat, ce qui suggère qu'UL97 garderait sa capacité à le phosphoryler. Cependant, ces changements d'acides aminés, et délétions pourraient provoquer un changement de conformation de la protéine qui empêcherait l'accès du substrat au site catalytique de la protéine. Il serait intéressant de vérifier l'effet de ses mutations et délétions sur la phosphorylation d'autres substrats de la protéine tel que le facteur de transcription E<sub>2</sub>F et la protéine p32 qui seraient au préalable produites en lysat de réticulocytes. Un autre moyen de vérifier les changements de conformation éventuels causés par ces mutations et délétions serait de générer par bioinformatique des modèles tridimensionnels de la protéine UL97 portant ses mutations et délétions. Ce projet fait partie du projet mené actuellement par Anthony Couvreur dans le cadre d'un post-doctorat dans le laboratoire. Enfin, il est possible que ces résultats soient dus à la production d'une forme inactive des protéines mutées à partir des plasmides utilisés, bien que les séquences de ces plasmides aient été vérifiées et que les protéines proviennent de trois productions différentes.

Il reste à analyser l'effet des mutations introduites par mutagenèse dirigée en position 460 et 510 (nouvelles mutations).

Jusqu'à ce jour il n'a pas été proposé de système qui permette l'étude d'une activité kinase *in vitro* vis-à-vis d'un analogue de base sans avoir recours à la radioactivité, ce que nous proposons par le test que nous avons mis au point. De plus il permet une étude simultanée de l'effet de mutations d'une part sur la phosphorylation du GCV et d'autre part, l'effet de ces mutations sur l'activité de la kinase sur ces substrats naturels.

Par la suite, au laboratoire, il est prévu de produire des mutants UL97 tronqués du domaine IX afin de vérifier l'absence de phosphorylation de ses substrats. D'étudier le retentissement de mutations nouvelles, de façon générale, sur l'émergence de la résistance. Ce système pourra aussi être appliqué à l'étude d'autres antiviraux tels que le maribavir qui est disponible au niveau du laboratoire et qui cible cette protéine.



**Figure 27 : Structure prédictive de la protéine UL97**

Régions I à IX : domaines conservés de la protéine ; En bleu : site de fixation de l'ATP ; En orange : site catalytique de la protéine ; Région IX et orange : domaine de liaison au GCV

### **III. Recherche de nouveaux anti-CMV**

#### **1. Les flavonoïdes comme anti-CMV**

Comme nous avons pu le voir, l'infection du sujet immunodéprimé ou du fœtus peut compromettre le pronostic vital. La toxicité des molécules actuellement proposées, interdisant leur utilisation chez la femme enceinte et l'émergence de mutants résistants après greffe d'organe ou de moelle, rend nécessaire le développement de nouvelles molécules. Une famille de molécules : les flavonoïdes s'avèreraient particulièrement intéressante en raison de leur faible toxicité et de la capacité pour certaines d'entre elles à inhiber les étapes très précoces du cycle viral du CMVH. En nous basant sur les travaux d'Evers et al., 2005, nous avons pu mettre en place ou adapter des outils d'analyse fiables pour étudier ces molécules. Nous avons ainsi confirmé l'efficacité de la baïcaléine et à moindre mesure de la quercétine, à inhiber à faible concentration les étapes très précoces du cycle viral du CMVH. Nous avons aussi confirmé que leur toxicité est faible mais que d'autres sous-familles peuvent, au contraire s'avérer assez toxiques. Enfin la quercétagétine, quant à elle inhibe l'activité de l'ADN polymérase virale.

## **Publication 4**

Etude de l'inhibition de la réplication du CMVH par 8 flavonoïdes

*Eight flavonoids and their potential to inhibit  
human cytomegalovirus replication*

*(Soumis dans Antiviral Res.)*

EIGHT FLAVONOIDS AND THEIR POTENTIAL TO INHIBIT HUMAN  
CYTOMEGALOVIRUS REPLICATION

Sébastien Cotin<sup>1</sup>, Claude Calliste<sup>2</sup>, Marie-Christine Mazon<sup>4</sup>, Sébastien Hantz<sup>1,3</sup>, Jean-Luc Duroux<sup>2</sup>, Marie-Cécile Ploy<sup>1</sup>, Sophie Alain<sup>1,3</sup>

<sup>1</sup> EA3175 Avenir INSERM, University of Limoges, Limoges, France

<sup>2</sup> EA4021 University of Limoges, Limoges, France

<sup>3</sup> National reference Center for Cytomegaloviruses, Bacteriology-Virology-Hygiene department CHU Limoges, France

<sup>4</sup> Associate laboratory for the National reference Center for Cytomegaloviruses, Bacteriology-Virology-Hygiene department, Lariboisière Hospital, Paris, France

**Corresponding author :**

Prof. Sophie Alain MD, PhD

Centre National de Référence des Cytomégalovirus

Laboratoire de Virologie, CHU Limoges, 2 avenue Martin Luther King, 87000 Limoges

EA 3175, Faculté de Médecine, Limoges

Tel 00 33 5 55 05 67 28 / 67 24

Fax 00 33 5 55 05 65 21

e-mail: [sophie.alain@unilim.fr](mailto:sophie.alain@unilim.fr)

Malgré de nombreuses pistes quant au développement de nouvelles molécules antivirales les composés qui arrivent au stade des essais cliniques sont très peu nombreuses. Des travaux (Evers et al., 2005) ont démontré l'intérêt potentiel des flavonoïdes comme anti-CMVH en se focalisant sur la baïcaléine, la génistéine et notamment sur l'étude de leurs mécanismes d'action sur les étapes très précoces du cycle viral. Dans notre travail, nous avons souhaité étendre ce champ de recherche aux différentes familles de flavonoïdes, avec un intérêt particulier pour la quercétine, dont l'activité antivirale sur le CMVH, le HSV, ainsi que la synergie avec l'acyclovir nous ont paru intéressantes, dans l'optique d'une prévention plus large des infections à herpèsvirus, notamment chez les immunodéprimés. Par ailleurs, la faible toxicité de ces molécules en fait des candidats potentiels au traitement des infections à CMV chez la femme enceinte. La possibilité de collaborer avec une équipe spécialisée dans les relations structure-activité de ces molécules permettait d'envisager une sélection des molécules les plus efficaces, voir la modification des composés les plus intéressants : Il convenait de choisir celle qui donnait les meilleurs résultats et qui avait été étudiée le plus en profondeur, afin de valider les différents tests de cette étude : la baïcaléine. La quercétine nous est ensuite apparue comme étant très intéressante car elle semblait posséder une cytotoxicité très faible, combinée à un pouvoir inhibiteur des plus corrects. La baïcaléine est une flavone qui possède des groupements hydroxyles sur les carbones 5, 6 et 7 de son cycle A et aucun autre groupement fonctionnel sur ses cycles B et C. Nous nous sommes donc proposés de vérifier si l'efficacité de la baïcaléine ne résidait pas simplement de la position de ces trois groupements hydroxyles. C'est pour cela que nous avons choisi d'étudier un acide phénolique : l'acide gallique qui possède une similitude structurale avec le cycle A de la baïcaléine. La quercétagétine, un autre flavonol, a quant à elle, été retenue car elle possède à la fois les caractéristiques de la baïcaléine sur son cycle A et les caractéristiques de la quercétine sur ses cycles B et C. Enfin, les chalcones constituent une famille de molécule extrêmement peu étudiée pour leur activité antimicrobienne ; nous nous sommes donc proposés d'en choisir deux pour notre étude : la 2',3',4'trihydroxychalcone, identique à la baïcaléine sur ses cycles A et B, ainsi que la butéine, identique à la quercétine sur ses cycles A et B.

Pour mettre en place les outils nécessaires au tri des molécules et à la compréhension des mécanismes d'action, nous avons adapté des essais antiviraux et des essais de toxicité à partir de techniques développées au laboratoire. La bonne corrélation globale entre nos résultats de  $CI_{50}$  et ceux d'Evers et al. a permis de valider nos essais antiviraux et nos essais de toxicité en prenant comme référence la baïcaléine et la quercétine. Cependant, quelques points diffèrent

et peuvent s'expliquer par l'utilisation de souches de fibroblastes différentes, de souches virales différentes et de concentration différentes de l'inoculum mais aussi par le mode de synthèse et de purification des molécules étudiées. On sait, en effet que la provenance des flavonoïdes peut faire varier leur degré de pureté et donc leur efficacité antibactérienne ou antivirale (Wu et al. 1998).

Les résultats de  $CI_{50}$  pour la baïcaléine et la quercétine sont légèrement supérieurs à ceux obtenus par Evers, mais l'ordre d'efficacité des molécules est respecté et leur toxicité est identique à celle observée pour Evers, y compris sur les cellules en croissance, plus sensibles à la toxicité.

En ce qui concerne l'activité antivirale globale des molécules à partir desquelles nous avons travaillé, on peut s'apercevoir de plusieurs choses. Tout d'abord, l'acide gallique ne possède aucun pouvoir inhibiteur, de plus, cette molécule s'avère être très toxique, en particulier sur les cellules en croissance. Il est donc probable que l'activité antivirale générale des flavonoïdes soit liée à leur structure chimique particulière et non à la présence d'un des cycles qui les constitue. Cette supposition reste toutefois contestable en raison de la présence du groupement acide carboxylique de l'acide gallique, qui n'est présent sur aucune autre molécule testée. En revanche, l'absence du groupement cétonique est plus discutable car certains flavonoïdes, comme les anthocyanidines ou les flavanes ne possèdent pas ce groupement sur leur cycle C et possèdent pourtant une activité antivirale démontrée (Selway et al., 1986). Les deux chalcones que nous avons étudié se sont révélés être plutôt toxiques, surtout la butéine pour laquelle la cytotoxicité empêche le calcul de toute concentration inhibitrice virale. La 2',3',4'trihydroxychalcone l'est aussi, mais à moindre mesure. En effet sa toxicité est assez comparable à celle du ganciclovir mais elle est loin de posséder son pouvoir inhibiteur. Pour cette chalcone la  $CI_{50}$  est trouvée à 48  $\mu M$  mais cette valeur est en fait assez peu fiable car à cette concentration la toxicité atteint déjà presque 20%. Cette toxicité rend, d'une part le décompte du nombre de foyers infectieux assez difficile et d'autre part elle vient parasiter la détermination de la  $CI_{50}$  par le test colorimétrique basé sur l'activité  $\beta$ -galactosidase. En effet, l'état des cellules est, par conséquent, en partie responsable de la baisse du niveau de protéines virales synthétisées. Avec la quercétagétine le problème est similaire même si l'activité anti-CMVH est un peu plus importante.

Si l'on compare respectivement la baïcaléine et la quercétine avec leurs chalcones homologues respectives, on s'aperçoit que la 2',3',4'trihydroxychalcone est un meilleur inhibiteur que la butéine, tout comme la baïcaléine est un meilleur inhibiteur que la quercétine. Il semble donc que la présence des groupements hydroxyles en 3, 6 et 7 du cycle

A ait une importance, mais dans une moindre mesure que la configuration globale des cycles B et C. Pour vérifier cela il pourrait être intéressant d'étudier si l'activité antivirale augmente pour un homologue de la quercétagétine sans le groupement hydroxyle en C3 (une molécule qu'il faudrait synthétiser) et si cette même activité diminue pour l'homologue de la baïcaléine sans le groupement hydroxyle en C6 : la 5,7dihydroxyflavone. Pour aller plus loin, on pourrait comparer l'activité de cette dernière avec celle de la lutéoline (homologue de la quercétine sans l'hydroxyle en C6) et regarder l'activité de la galangine (homologue de la quercétine sans les hydroxyles du cycle B). Toutes ces comparaisons permettraient à terme, de déterminer l'ordre de priorité des diverses substitutions des carbones, dans les variations d'activité antivirales. Enfin, il semblerait que le cycle C ouvert des chalcones soit un facteur majeur intervenant dans la toxicité de cette famille de molécule, cependant cette affirmation demande confirmation par l'étude de la cytotoxicité d'autres chalcones.

La quercétagétine est la seule des six molécules testées à inhiber efficacement l'activité polymérisique de l'ADN polymérase du CMVH contrairement à la quercétine qui possède seulement un hydroxyle en moins en C6. Cette inhibition semble seulement efficace *in vitro* puisque, si on se place à la CI90 de 100  $\mu\text{M}$  ainsi trouvée, le pourcentage d'inhibition globale du cycle viral n'est que d'environ 55%. Les études sur la quercétagétine ne seront pas poursuivies en raison de sa toxicité, cependant, il est intéressant de constater certains flavonoïdes peuvent inhiber efficacement la réplication de l'ADN viral.

La mise en place de ces quelques tests d'étude de l'interaction entre les flavonoïdes et l'infection par le CMVH va permettre de poursuivre le travail entamé par un criblage d'autres molécules. L'étude des molécules les plus pertinentes pourra éventuellement conduire à modéliser, voir à synthétiser des flavonoïdes les plus efficaces et les moins toxiques possible. Enfin, il a déjà été démontré que certains flavonoïdes peuvent agir en synergie entre eux ou avec d'autres molécule. Il pourrait donc être intéressant de tester des combinaisons de flavonoïdes notamment des composés agissant à différents stade du cycle cellulaire, afin de combiner les effets et ainsi utiliser des concentrations moindres. Les CI50 obtenues par le test colorimétriques sont elles aussi supérieures à celles d'Evers, surtout pour la baïcaléine pour laquelle on a une augmentation d'un facteur 30 avec nos résultats qui reste encore à expliquer. Pour la quercétine, les résultats obtenus restent cohérent si l'on tient compte du premier décalage. Enfin, les résultats du western blot visant à détecter une inhibition de la synthèse des protéines très précoces en présence de baïcaléine, donnent des résultats identiques. Ceux réalisés avec la quercétine et la quercétagétine montre que la première n'agit que partiellement sur la phase très précoce, et que la seconde n'a aucune action à ce niveau. Ceci

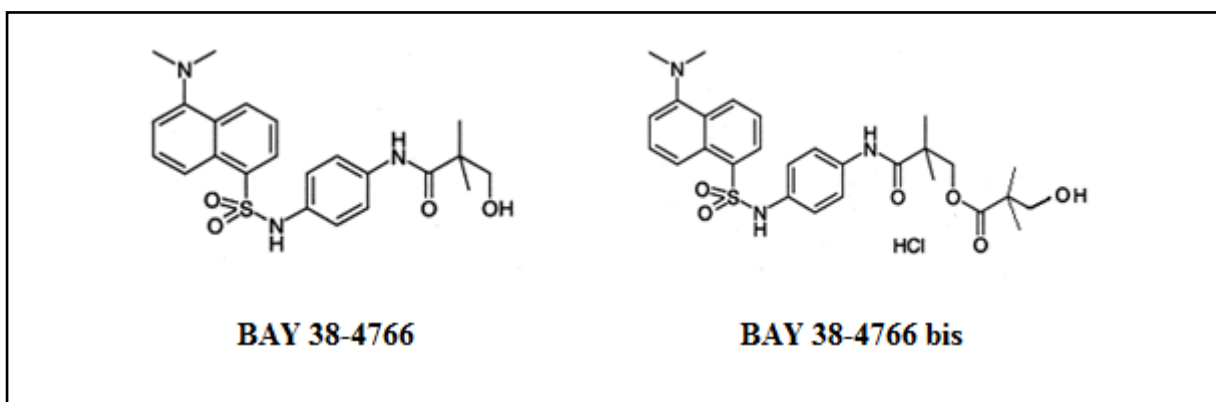


confirme que seule la baïcaléine possède un pouvoir antiviral très important, ciblé en amont et/ou directement sur la synthèse des protéines très précoces. Cette action, ciblée sur l'étape très précoce, serait, comme le démontre Evers directement tournée contre l'activité tyrosine kinase du récepteur à l'EGF empêchant la translocation nucléaire du CMVH. La cohérence globale des résultats que nous avons obtenus, avec les résultats d'Evers pour les deux molécules identiques étudiées tend à valider l'ensemble de nos résultats.

## 2. Etude complémentaire sur les nouveaux antiviraux

L'analyse de la séquence complète du gène *UL97* chez les isolats résistants au ganciclovir étudiés au laboratoire n'a pas permis de retrouver de mutation de résistance au maribavir, ou de polymorphisme nouveau dans la région de fixation de l'ATP. Nous avons étudié la sensibilité au maribavir d'une souche résistante des patient, et comparé sa sensibilité à celle d'isolats naïfs d'antiviraux et à une souche de référence.

Le maribavir est un indolocarbazole, molécule proche des benzimidazolés mais de configuration lévogyre. Afin de mieux situer la place de cet antiviral parmi les nouveaux choix thérapeutiques, nous avons étudié les possibilités de synergie avec d'autres classes d'antiviraux, notamment les benzimidazolés inhibiteurs des terminases du CMV tels que le BAY 38-4766 (Hallenberger, 2004) et un dérivé estérifié, BAY 38-4766 bis (Figure 28). En parallèle, nous avons comparé la toxicité de ces molécules sur fibroblastes confluent et en croissance à l'aide du kit « CytoTox96® Non-Radioactive cytotoxicity assay » de Proméga™ en prenant comme référence la molécule la plus utilisée actuellement, le ganciclovir.



**Figure 28** : Structure chimique des deux benzimidazolés étudiés

La poudre de maribavir (don de Viropharma™) conservée à +4°C à l'obscurité a été remise en suspension en DMSO sous formes de solution mère à 100 mM stockée à -80°C. Les benzimidazolés (bay3384766) ont été synthétisés par l'équipe de Serge Bouaziz (UMR8015), dilués en DMSO et conservés sous forme de solution mère à 100 mM.

Les essais antiviraux ont été effectués selon la méthode classique de mesure de la réduction de 50% du nombre de foyers infectieux en comparaison avec un contrôle sans ajout de la molécule testée. Des fibroblastes embryonnaires humains sont mis en culture en plaques 48 puits jusqu'à confluence et infectés pendant 3 heures avec 0,1 ufc/ml de virions libres de CMVH. Le milieu de culture est ensuite remplacé par du milieu frais dans lequel est diluée la molécule testée à différentes concentrations. Les plaques sont incubées 5 jours à 37°C et 5% de CO<sub>2</sub> et les foyers de CMVH sont comptés à l'aide d'un microscope inversé et la CI<sub>50</sub> est déduite graphiquement. Les essais de synergie ont été effectués selon le même protocole en prenant une concentration fixe d'une molécule et en faisant varier la deuxième.

Les résultats de cytotoxicité, des essais antiviraux et des tests de synergie sont indiqués dans les tableaux ci-dessous (Tableau 4 et Tableau 5) :

	CC <sub>50</sub> sur fibroblastes confluents (µM)	CC <sub>50</sub> sur fibroblastes en croissance (µM)
GCV	110	110
BAY 38-4766	1250	800
BAY 38-4766 bis	1450	76

**Tableau 4 : Cytotoxicité des dérivés benzimidazolés étudiés**

Composé testé	Composé fixé	CI <sub>50</sub> (en µM)
BAY 38-4766	-	1,5
BAY 38-4766 bis	-	1,8
maribavir	-	0,78
maribavir	BAY 38-4766 1µM	0,38
	BAY 38-4766 10µM	0,025
	BAY 38-4766 bis 1µM	0,6
	BAY 38-4766 bis 10µM	0,04

**Tableau 5 : Essais antiviraux sur deux dérivés benzimidazolés et synergie avec le MBV**

Efficacité du maribavir sur souches naïves et souche résistante aux inhibiteurs de polymérase (Tableau 6) :

Souche ou isolats	GCV	CDV	PFA	MBV (CI <sub>50</sub> en µM)
AD169	S	S	S	0,78
Vid	S	S	S	0,65
Bou	S	S	S	0,4
Cha UL97 C592G UL54 N408K	R	R	R	0,75

**Tableau 6 : Essais antiviraux du MBV sur trois isolats de CMVH**

S : sensible ; R : résistant

#### Conclusions :

Concernant le MBV les CI<sub>50</sub> observées sont compatibles avec les concentrations plasmatiques résiduelles obtenues lors des essais de phase I (Lalezari et al., 2002). Les premiers essais cliniques publiés chez des patients présentant des résistances multiples aux antiviraux montrent toutefois que l'efficacité antivirale nécessite des doses élevées (800 mg à 1600 mg/j) et dépend probablement d'autres facteurs puisque parmi les six patients traités quatre seulement ont répondu au traitement. Une ATU est en cours en France depuis juin, qui devrait permettre de mieux évaluer l'efficacité de cette molécule. Une place possible pour cet antiviral, compte tenu de sa très faible toxicité *in vitro* et *in vivo* (Winston et al., 2008) serait une administration en combinaison avec d'autres molécules synergiques, de cibles différentes, telles que les inhibiteurs de terminases. Nous démontrons ci-dessus *in vitro* la possibilité d'utiliser le maribavir sur les souches résistantes aux antiviraux et la possibilité de combinaisons efficaces entre le maribavir et les inhibiteurs de terminases.

La forme esterifiée de la molécule BAY 38-4766 conduit à une diminution d'efficacité et à une augmentation de sa toxicité. Le développement de cette molécule a été arrêté en raison de sa mauvaise biodisponibilité, et l'on conçoit ici la difficulté d'améliorer la biodisponibilité tout en conservant l'efficacité.

## **Discussion**

Les molécules actuellement disponibles pour traiter les infections à CMV demeurent peu nombreuses et non dénuées de toxicité et leur utilisation peut conduire à des effets secondaires néfastes et à l'émergence de résistances. Dans ces circonstances, chez les transplantés, il y a parfois rejet du greffon avec une élévation du risque de décès (Bhorade et al., 2002). La connaissance des mutations de résistances, leur diagnostic fiable et rapide est donc de première importance pour une meilleure prise en charge du patient et afin d'éviter la survenue de complications graves. De plus, le développement de nouvelles molécules antivirales pour lutter contre ces infections doit rester, lui aussi une priorité.

La caractérisation des mutations de résistance des souches de CMV passe dans notre laboratoire par le génotypage systématique des gènes *UL97* (Alain et al., 2004) et *UL54*. 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). Cette méthode s'appuie sur l'analyse standardisée des résultats, grâce aux banques de données et peuvent s'adapter rapidement à la détection des nouvelles mutations de résistance, par simple remise à jour de ces banques. Cette méthode permet aussi, à travers l'analyse de leur polymorphisme naturel de mieux connaître les protéines impliquées dans le mécanisme d'action des antiviraux. Les plupart des mutations rencontrées suite à ces génotypages étaient déjà décrites mais il a aussi été possible d'en mettre en évidence de nouvelles dont l'imputabilité dans la résistance restait à prouver. Afin de caractériser précisément le rôle, dans la résistance, de deux mutations dans *UL54* apparaissant secondairement à une mutation dans *UL97*, nous avons utilisé la méthode des BAC (Borst et al., 2007) et nous avons produit des virus recombinants sur la base de la souche de référence AD169 dans laquelle a été intégré le gène codant la GFP et la mutation étudiée. Nous disposons grâce au développement de ce test 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 effet, il est ainsi possible 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. Notre travail avec cette approche nous a permis de mettre en évidence, pour les mutations N408S et  $\Delta 421$ , un rôle dans la résistance au GCV pour la première et un rôle plus modéré de la deuxième dans la résistance au GCV et au CDV.

Cette technique, qui a déjà démontré sa faisabilité et son utilité (Borst et al., 2007) va permettre par la suite de poursuivre la caractérisation de nouvelles mutations aussi bien dans *UL54* que dans *UL97*. Toutefois, bien qu'utile dans la compréhension du fonctionnement et de la structure des protéines impliquées dans la résistance et dans l'incrémentation des bases de données de mutations, cette technique, comme toute autre technique de phénotypage, a une durée de réalisation qui n'est pas compatible pour une utilisation en routine.

En plus de ces études 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 cytomégalo virus aux antiviraux après transplantation d'organe et greffe de moelle, à l'ère de la prophylaxie » mené par le CNR Cytomégalo virus qui regroupe 33 centres et a permis d'inclure plus de 800 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 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., 2006). Cependant, nous avons observé un nombre important de mutations dans *UL54* par rapport à ce qui est habituellement rapporté et parmi elles, certaines n'ont jamais été décrites. Ce phénomène a également été rapporté dans une étude sur une population de 275 patients transplantés d'organe solide ayant reçu une prophylaxie par VGCV (Boivin et al., 2009). La plupart de ces mutations restent à explorer pour connaître leur impact sur la résistance.

En parallèle de ces travaux sur les mutations de résistance d'*UL54* et *UL97* nous avons aussi étudié les supports moléculaires des résistances aux antiviraux, dont la connaissance est essentielle pour la compréhension des processus de résistance et pour le développement de nouvelles molécules ou l'amélioration des molécules utilisées actuellement. Une étude efficace de ces mécanismes sous-entend une bonne connaissance de la structure des protéines impliquées. En 2009, une étude a montré qu'*UL27* n'était pas une cible directe du MBV (Chou, 2009) comme cela avait été suggéré antérieurement. L'analyse des régions conservées de cette protéine nous a conduits à émettre l'hypothèse d'une zone d'interaction caractérisée par une structure en hélice  $\alpha$  et de conclure qu'*UL27* interviendrait dans la régulation de

l'activité d'UL97 et non comme cible directe du MBV. L'hypothèse d'un domaine d'interaction protéine-protéine au sein de la région III d'UL27 que nous avons mis en évidence semble se confirmer par les résultats d'une étude récente (Reitsma et al., 2011) même si cette interaction semble plus particulièrement concerner des cibles cellulaires, notamment avec le complexe acétyltransférase cellulaire Tip60, ce processus étant lié au blocage du cycle cellulaire.

Concernant UL97 nous avons mis au point un test d'activité kinase non radioactif, facile à mettre en œuvre contrairement à ce qui a pu être décrit précédemment (Marschall et al., 2001). Jusqu'à ce jour il n'avait pas été proposé de système qui permette l'étude d'une activité kinase *in vitro* vis-à-vis d'un analogue de base sans avoir recours à la radioactivité. De plus, il permet une étude simultanée de l'effet de mutations d'une part sur la phosphorylation du GCV et d'autre part, l'effet de ces mutations sur l'activité de la kinase sur ces substrats naturels. Il reste à produire des mutants UL97 tronqués du domaine IX afin de vérifier l'absence de phosphorylation de ses substrats. D'étudier le retentissement de mutations nouvelles, de façon générale, sur l'émergence de la résistance. Ce système pourra aussi être appliqué à l'étude d'autres antiviraux tels que le MBV.

Bien que de nombreuses pistes quant au développement de nouvelles molécules antivirales soient en cours d'investigation, bien peu de composés arrivent jusqu'au stade des essais cliniques, c'est le cas du CPV, en phase I (Wu et al., 2009), du CMX001 (Quenelle et al., 2010) et de l'AIC246 (Lischka et al., 2010), tous deux en phase II et du MBV en phase III. Devant la demande en composés actifs et peu toxiques nous avons mené une étude sur des membres d'une famille de molécules, les flavonoïdes qui s'avèreraient particulièrement intéressante en raison de leur faible toxicité et de la capacité pour certaines d'entre elles à inhiber les étapes très précoces du cycle viral du CMVH. En nous basant sur les travaux d'Evers et al., 2005, nous avons pu mettre en place ou adapter des outils d'analyse fiables pour étudier ces molécules. Nous avons ainsi confirmé l'efficacité de la baïcaléine et à moindre mesure de la quercétine, à inhiber à faible concentration les étapes très précoces du cycle viral du CMVH. Nous avons aussi confirmé que leur toxicité est faible mais que d'autres sous-familles peuvent, au contraire s'avérer assez toxiques. Enfin la quercétagétine, quant à elle inhibe l'activité de l'ADN polymérase virale. Le potentiel de cette famille de plusieurs milliers de composés reste un énorme champ d'investigation.

Dans la continuité de l'étude de ces nouvelles molécules antivirale, il est prévu de réaliser au laboratoire des essais sur modèle animal. Ce modèle est en cours de développement dans le

cadre d'une thèse menée par Lucie Morère et repose sur l'implantation de tissu trophoblastique humain provenant de placentas de premier trimestre de grossesse de femme séronégatives pour le CMV chez des souris SCID en sous cutané. Ce modèle a été créé pour mettre à jour les mécanismes encore mal connus de la transmission materno fœtale du CMVH et s'avère un outil pratique pour l'étude, à la fois de la toxicité et de l'efficacité des nouvelles molécules antivirales.



## Références

- Adler, B., and Sinzger, C. (2009). Endothelial cells in human cytomegalovirus infection: one host cell out of many or a crucial target for virus spread? *Thromb Haemost* **102**(6), 1057-63.
- Adler, S. P., Hempfling, S. H., Starr, S. E., Plotkin, S. A., and Riddell, S. (1998). Safety and immunogenicity of the Towne strain cytomegalovirus vaccine. *Pediatr Infect Dis J* **17**(3), 200-6.
- Akula, S. M., Hurley, D. J., Wixon, R. L., Wang, C., and Chase, C. C. (2002). Effect of genistein on replication of bovine herpesvirus type 1. *Am J Vet Res* **63**(8), 1124-8.
- Alain, S., Cotin, S., Hantz, S. (2010). Résistance du cytomegalovirus aux antiviraux. *Virologie* **13**, 215-22.
- Alain, S., Hantz, S., Denis, F. (2008). La quantification du cytomégalovirus en pratique. *Spectra Biologie*. **166**, 38-44.
- Alain, S., Hantz, S., Scieux, C., Karras, A., Mazon, M. C., Szlag, J. C., Imbert, B. M., Fillet, A. M., Gouarin, S., Mengelle, C., De Wilde, A., Cogne, N., Champier, G., Rogez, S., Legendre, C., and Denis, F. (2004). Detection of ganciclovir resistance after valganciclovir-prophylaxis in renal transplant recipients with active cytomegalovirus infection. *J Med Virol* **73**(4), 566-73.
- Amoros, M., Simoes, C. M., Girre, L., Sauvager, F., and Cormier, M. (1992). Synergistic effect of flavones and flavonols against herpes simplex virus type 1 in cell culture. Comparison with the antiviral activity of propolis. *J Nat Prod* **55**(12), 1732-40.
- Anders, D. G., and Gibson, W. (1988). Location, transcript analysis, and partial nucleotide sequence of the cytomegalovirus gene encoding an early DNA-binding protein with similarities to ICP8 of herpes simplex virus type 1. *J Virol* **62**(4), 1364-72.
- Anders, D. G., and McCue, L. A. (1996). The human cytomegalovirus genes and proteins required for DNA synthesis. *Intervirology* **39**(5-6), 378-88.
- Arav-Boger, R., He, R., Chiou, C. J., Liu, J., Woodard, L., Rosenthal, A., Jones-Brando, L., Forman, M., and Posner, G. Artemisinin-derived dimers have greatly improved anti-cytomegalovirus activity compared to artemisinin monomers. *PLoS One* **5**(4), e10370.
- Arora, N., Novak, Z., Fowler, K. B., Boppana, S. B., and Ross, S. A. Cytomegalovirus viraemia and DNAemia in healthy seropositive women. *J Infect Dis* **202**(12), 1800-3.
- Arvin, A. M., Fast, P., Myers, M., Plotkin, S., and Rabinovich, R. (2004). Vaccine development to prevent cytomegalovirus disease: report from the National Vaccine Advisory Committee. *Clin Infect Dis* **39**(2), 233-9.
- Asberg, A., Humar, A., Rollag, H., Jardine, A. G., Mouas, H., Pescovitz, M. D., Sgarabotto, D., Tuncer, M., Noronha, I. L., and Hartmann, A. (2007). Oral valganciclovir is noninferior to intravenous ganciclovir for the treatment of cytomegalovirus disease in solid organ transplant recipients. *Am J Transplant* **7**(9), 2106-13.
- Avery, R. K., Bolwell, B. J., Yen-Lieberman, B., Lurain, N., Waldman, W. J., Longworth, D. L., Taege, A. J., Mossad, S. B., Kohn, D., Long, J. R., Curtis, J., Kalaycio, M., Pohlman, B., and Williams, J. W. (2004). Use of leflunomide in an allogeneic bone marrow transplant recipient with refractory cytomegalovirus infection. *Bone Marrow Transplant* **34**(12), 1071-5.

- Baek, M. C., Krosky, P. M., and Coen, D. M. (2002). Relationship between autophosphorylation and phosphorylation of exogenous substrates by the human cytomegalovirus UL97 protein kinase. *J Virol* **76**(23), 11943-52.
- Baker, M. L., Jiang, W., Rixon, F. J., and Chiu, W. (2005). Common ancestry of herpesviruses and tailed DNA bacteriophages. *J Virol* **79**(23), 14967-70.
- Baldanti, F., Silini, E., Sarasini, A., Talarico, C. L., Stanat, S. C., Biron, K. K., Furione, M., Bono, F., Palu, G., and Gerna, G. (1995). A three-nucleotide deletion in the UL97 open reading frame is responsible for the ganciclovir resistance of a human cytomegalovirus clinical isolate. *J Virol* **69**(2), 796-800.
- Baldanti, F., Underwood, M. R., Stanat, S. C., Biron, K. K., Chou, S., Sarasini, A., Silini, E., and Gerna, G. (1996). Single amino acid changes in the DNA polymerase confer foscarnet resistance and slow-growth phenotype, while mutations in the UL97-encoded phosphotransferase confer ganciclovir resistance in three double-resistant human cytomegalovirus strains recovered from patients with AIDS. *J Virol* **70**(3), 1390-5.
- Baldanti, F., Underwood, M. R., Talarico, C. L., Simoncini, L., Sarasini, A., Biron, K. K., and Gerna, G. (1998). The Cys607-->Tyr change in the UL97 phosphotransferase confers ganciclovir resistance to two human cytomegalovirus strains recovered from two immunocompromised patients. *Antimicrob Agents Chemother* **42**(2), 444-6.
- Balint, G. A. (2001). Artemisinin and its derivatives: an important new class of antimalarial agents. *Pharmacol Ther* **90**(2-3), 261-5.
- Battiwalla, M., Paplham, P., Almyroudis, N. G., McCarthy, A., Abdelhalim, A., Elefante, A., Smith, P., Becker, J., McCarthy, P. L., and Segal, B. H. (2007). Leflunomide failure to control recurrent cytomegalovirus infection in the setting of renal failure after allogeneic stem cell transplantation. *Transpl Infect Dis* **9**(1), 28-32.
- Beadle, J. R., Hartline, C., Aldern, K. A., Rodriguez, N., Harden, E., Kern, E. R., and Hostetler, K. Y. (2002). Alkoxyalkyl esters of cidofovir and cyclic cidofovir exhibit multiple-log enhancement of antiviral activity against cytomegalovirus and herpesvirus replication in vitro. *Antimicrob Agents Chemother* **46**(8), 2381-6.
- Beadle, J. R., Wan, W. B., Ciesla, S. L., Keith, K. A., Hartline, C., Kern, E. R., and Hostetler, K. Y. (2006). Synthesis and antiviral evaluation of alkoxyalkyl derivatives of 9-(S)-(3-hydroxy-2-phosphonomethoxypropyl)adenine against cytomegalovirus and orthopoxviruses. *J Med Chem* **49**(6), 2010-5.
- Beard, P. M., Taus, N. S., and Baines, J. D. (2002). DNA cleavage and packaging proteins encoded by genes U(L)28, U(L)15, and U(L)33 of herpes simplex virus type 1 form a complex in infected cells. *J Virol* **76**(10), 4785-91.
- Beecher, G. R. (2003). Overview of dietary flavonoids: nomenclature, occurrence and intake. *J Nutr* **133**(10), 3248S-3254S.
- Bhorade, S. M., Lurain, N. S., Jordan, A., Leischner, J., Villanueva, J., Durazo, R., Creech, S., Vigneswaran, W. T., and Garrity, E. R. (2002). Emergence of ganciclovir-resistant cytomegalovirus in lung transplant recipients. *J Heart Lung Transplant* **21**(12), 1274-82.
- Bidanset, D. J., Beadle, J. R., Wan, W. B., Hostetler, K. Y., and Kern, E. R. (2004). Oral activity of ether lipid ester prodrugs of cidofovir against experimental human cytomegalovirus infection. *J Infect Dis* **190**(3), 499-503.

- Bidanset, D. J., Rybak, R. J., Hartline, C. B., and Kern, E. R. (2004). Efficacy of ganciclovir and cidofovir against human cytomegalovirus replication in SCID mice implanted with human retinal tissue. *Antiviral Res* **63**(1), 61-4.
- Biron, K. K. (2006). Antiviral drugs for cytomegalovirus diseases. *Antiviral Res* **71**(2-3), 154-63.
- Biron, K. K., Fyfe, J. A., Stanat, S. C., Leslie, L. K., Sorrell, J. B., Lambe, C. U., and Coen, D. M. (1986). A human cytomegalovirus mutant resistant to the nucleoside analog 9-([2-hydroxy-1-(hydroxymethyl)ethoxy]methyl)guanine (BW B759U) induces reduced levels of BW B759U triphosphate. *Proc Natl Acad Sci U S A* **83**(22), 8769-73.
- Biron, K. K., Harvey, R. J., Chamberlain, S. C., Good, S. S., Smith, A. A., 3rd, Davis, M. G., Talarico, C. L., Miller, W. H., Ferris, R., Dornsife, R. E., Stanat, S. C., Drach, J. C., Townsend, L. B., and Kozzalka, G. W. (2002). Potent and selective inhibition of human cytomegalovirus replication by 1263W94, a benzimidazole L-riboside with a unique mode of action. *Antimicrob Agents Chemother* **46**(8), 2365-72.
- Boeckh, M. (1999). Current antiviral strategies for controlling cytomegalovirus in hematopoietic stem cell transplant recipients: prevention and therapy. *Transpl Infect Dis* **1**(3), 165-78.
- Boeckh, M., and Ljungman, P. (2009). How we treat cytomegalovirus in hematopoietic cell transplant recipients. *Blood* **113**(23), 5711-9.
- Bogner, E., Radsak, K., and Stinski, M. F. (1998). The gene product of human cytomegalovirus open reading frame UL56 binds the pac motif and has specific nuclease activity. *J Virol* **72**(3), 2259-64.
- Boivin, G., Goyette, N., Gilbert, C., and Covington, E. (2005). Analysis of cytomegalovirus DNA polymerase (UL54) mutations in solid organ transplant patients receiving valganciclovir or ganciclovir prophylaxis. *J Med Virol* **77**(3), 425-9.
- Boivin, G., Goyette, N., Rollag, H., Jardine, A. G., Pescovitz, M. D., Asberg, A., Ives, J., Hartmann, A., and Humar, A. (2009). Cytomegalovirus resistance in solid organ transplant recipients treated with intravenous ganciclovir or oral valganciclovir. *Antivir Ther* **14**(5), 697-704.
- Bonkowsky, H. L., Lee, R. V., and Klatskin, G. (1975). Acute granulomatous hepatitis. Occurrence in cytomegalovirus mononucleosis. *JAMA* **233**(12), 1284-8.
- Borst, E. M., Benkartek, C., and Messerle, M. (2007). Use of bacterial artificial chromosomes in generating targeted mutations in human and mouse cytomegaloviruses. *Curr Protoc Immunol* **Chapter 10**, Unit 10 32.
- Bourgeois, C., Sixt, N., Bour, J. B., and Pothier, P. (1997). Value of a ligase chain reaction assay for detection of ganciclovir resistance-related mutation 594 in UL97 gene of human cytomegalovirus. *J Virol Methods* **67**(2), 167-75.
- Boutolleau, D., Deback, C., Bressollette-Bodin, C., Conan, F., Ait-Arkoub, Z., Imbert-Marcille, B. M., and Agut, H. (2009). Genetic analysis and putative role in resistance to antivirals of the human cytomegalovirus DNA polymerase UL44 processivity factor. *Antivir Ther* **14**(6), 847-52.
- Braithwaite, D. K., and Ito, J. (1993). Compilation, alignment, and phylogenetic relationships of DNA polymerases. *Nucleic Acids Res* **21**(4), 787-802.
- Bravo, F. J., Cardin, R. D., and Bernstein, D. I. (2006). Effect of maternal treatment with cyclic HPMPC in the guinea pig model of congenital cytomegalovirus infection. *J Infect Dis* **193**(4), 591-7.

- Bresnahan, W. A., and Shenk, T. (2000). A subset of viral transcripts packaged within human cytomegalovirus particles. *Science* **288**(5475), 2373-6.
- Britt, W. J., and Mach, M. (1996). Human cytomegalovirus glycoproteins. *Intervirology* **39**(5-6), 401-12.
- Buerger, I., Reefschlaeger, J., Bender, W., Eckenberg, P., Popp, A., Weber, O., Graeper, S., Klenk, H. D., Ruebsamen-Waigmann, H., and Hallenberger, S. (2001). A novel nonnucleoside inhibitor specifically targets cytomegalovirus DNA maturation via the UL89 and UL56 gene products. *J Virol* **75**(19), 9077-86.
- Cha, T. A., Tom, E., Kemble, G. W., Duke, G. M., Mocarski, E. S., and Spaete, R. R. (1996). Human cytomegalovirus clinical isolates carry at least 19 genes not found in laboratory strains. *J Virol* **70**(1), 78-83.
- Champier, G. (2006). Cytomégalovirus humain et antiviraux : supports génétiques des résistances et cibles de nouveaux antiviraux. Thèse n°26-2006.
- Chee, M., Rudolph, S. A., Plachter, B., Barrell, B., and Jahn, G. (1989). Identification of the major capsid protein gene of human cytomegalovirus. *J Virol* **63**(3), 1345-53.
- Chee, M. S., Bankier, A. T., Beck, S., Bohni, R., Brown, C. M., Cerny, R., Horsnell, T., Hutchison, C. A., 3rd, Kouzarides, T., Martignetti, J. A., and et al. (1990). Analysis of the protein-coding content of the sequence of human cytomegalovirus strain AD169. *Curr Top Microbiol Immunol* **154**, 125-69.
- Chen, X., Kern, E. R., Drach, J. C., Gullen, E., Cheng, Y. C., and Zemlicka, J. (2003). Structure-activity relationships of (S,Z)-2-aminopurine methylenecyclopropane analogues of nucleosides. Variation of purine-6 substituents and activity against herpesviruses and hepatitis B virus. *J Med Chem* **46**(8), 1531-7.
- Chiang, L. C., Chiang, W., Liu, M. C., and Lin, C. C. (2003). In vitro antiviral activities of *Caesalpinia pulcherrima* and its related flavonoids. *J Antimicrob Chemother* **52**(2), 194-8.
- Choo, H., Beadle, J. R., Kern, E. R., Prichard, M. N., Keith, K. A., Hartline, C. B., Trahan, J., Aldern, K. A., Korba, B. E., and Hostetler, K. Y. (2007). Antiviral activities of novel 5-phosphonopent-2-en-1-yl nucleosides and their alkoxyalkyl phosphonoesters. *Antimicrob Agents Chemother* **51**(2), 611-5.
- Chou, S. Recombinant phenotyping of cytomegalovirus UL97 kinase sequence variants for ganciclovir resistance. *Antimicrob Agents Chemother* **54**(6), 2371-8.
- Chou, S. (2008). Cytomegalovirus UL97 mutations in the era of ganciclovir and maribavir. *Rev Med Virol* **18**(4), 233-46.
- Chou, S., Erice, A., Jordan, M. C., Vercellotti, G. M., Michels, K. R., Talarico, C. L., Stanat, S. C., and Biron, K. K. (1995). Analysis of the UL97 phosphotransferase coding sequence in clinical cytomegalovirus isolates and identification of mutations conferring ganciclovir resistance. *J Infect Dis* **171**(3), 576-83.
- Chou, S., Lurain, N. S., Thompson, K. D., Miner, R. C., and Drew, W. L. (2003). Viral DNA polymerase mutations associated with drug resistance in human cytomegalovirus. *J Infect Dis* **188**(1), 32-9.

- Chou, S., Lurain, N. S., Weinberg, A., Cai, G. Y., Sharma, P. L., and Crumpacker, C. S. (1999). Interstrain variation in the human cytomegalovirus DNA polymerase sequence and its effect on genotypic diagnosis of antiviral drug resistance. Adult AIDS Clinical Trials Group CMV Laboratories. *Antimicrob Agents Chemother* **43**(6), 1500-2.
- Chou, S., Marousek, G., Guentzel, S., Follansbee, S. E., Poscher, M. E., Lalezari, J. P., Miner, R. C., and Drew, W. L. (1997). Evolution of mutations conferring multidrug resistance during prophylaxis and therapy for cytomegalovirus disease. *J Infect Dis* **176**(3), 786-9.
- Chou, S., and Marousek, G. I. (2008). Accelerated evolution of maribavir resistance in a cytomegalovirus exonuclease domain II mutant. *J Virol* **82**(1), 246-53.
- Chou, S., Marousek, G. I., Van Wechel, L. C., Li, S., and Weinberg, A. (2007). Growth and drug resistance phenotypes resulting from cytomegalovirus DNA polymerase region III mutations observed in clinical specimens. *Antimicrob Agents Chemother* **51**(11), 4160-2.
- Chou, S., and Meichsner, C. L. (2000). A nine-codon deletion mutation in the cytomegalovirus UL97 phosphotransferase gene confers resistance to ganciclovir. *Antimicrob Agents Chemother* **44**(1), 183-5.
- Chou, S., Van Wechel, L. C., Lichy, H. M., and Marousek, G. I. (2005). Phenotyping of cytomegalovirus drug resistance mutations by using recombinant viruses incorporating a reporter gene. *Antimicrob Agents Chemother* **49**(7), 2710-5.
- Chou, S., Waldemer, R. H., Senters, A. E., Michels, K. S., Kemble, G. W., Miner, R. C., and Drew, W. L. (2002). Cytomegalovirus UL97 phosphotransferase mutations that affect susceptibility to ganciclovir. *J Infect Dis* **185**(2), 162-9.
- Chou, S., Wechel, L. C., and Marousek, G. I. (2007). Cytomegalovirus UL97 kinase mutations that confer maribavir resistance. *J Infect Dis* **196**(1), 91-4.
- Ciesla, S. L., Trahan, J., Wan, W. B., Beadle, J. R., Aldern, K. A., Painter, G. R., and Hostetler, K. Y. (2003). Esterification of cidofovir with alkoxyalkanols increases oral bioavailability and diminishes drug accumulation in kidney. *Antiviral Res* **59**(3), 163-71.
- Cihlar, T., and Chen, M. S. (1996). Identification of enzymes catalyzing two-step phosphorylation of cidofovir and the effect of cytomegalovirus infection on their activities in host cells. *Mol Pharmacol* **50**(6), 1502-10.
- Cihlar, T., Fuller, M. D., Mulato, A. S., and Cherrington, J. M. (1998). A point mutation in the human cytomegalovirus DNA polymerase gene selected in vitro by cidofovir confers a slow replication phenotype in cell culture. *Virology* **248**(2), 382-93.
- Colletti, K. S., Smallenburg, K. E., Xu, Y., and Pari, G. S. (2007). Human cytomegalovirus UL84 interacts with an RNA stem-loop sequence found within the RNA/DNA hybrid region of oriLyt. *J Virol* **81**(13), 7077-85.
- Compton, T. (2004). Receptors and immune sensors: the complex entry path of human cytomegalovirus. *Trends Cell Biol* **14**(1), 5-8.
- Compton, T., Nowlin, D. M., and Cooper, N. R. (1993). Initiation of human cytomegalovirus infection requires initial interaction with cell surface heparan sulfate. *Virology* **193**(2), 834-41.

- Crumpacker, C. S. (1992). Mechanism of action of foscarnet against viral polymerases. *Am J Med* **92**(2A), 3S-7S.
- Crumpacker, C. S. (1996). Ganciclovir. *N Engl J Med* **335**(10), 721-9.
- Cundy, K. C., Bidgood, A. M., Lynch, G., Shaw, J. P., Griffin, L., and Lee, W. A. (1996). Pharmacokinetics, bioavailability, metabolism, and tissue distribution of cidofovir (HPMPC) and cyclic HPMPC in rats. *Drug Metab Dispos* **24**(7), 745-52.
- Davison, A. J. (2002). Evolution of the herpesviruses. *Vet Microbiol* **86**(1-2), 69-88.
- Davison, A. J., Akter, P., Cunningham, C., Dolan, A., Addison, C., Dargan, D. J., Hassan-Walker, A. F., Emery, V. C., Griffiths, P. D., and Wilkinson, G. W. (2003). Homology between the human cytomegalovirus RL11 gene family and human adenovirus E3 genes. *J Gen Virol* **84**(Pt 3), 657-63.
- De Clercq, E., and Holy, A. (2005). Acyclic nucleoside phosphonates: a key class of antiviral drugs. *Nat Rev Drug Discov* **4**(11), 928-40.
- de Smet, M. D., Meenken, C. J., and van den Horn, G. J. (1999). Fomivirsen - a phosphorothioate oligonucleotide for the treatment of CMV retinitis. *Ocul Immunol Inflamm* **7**(3-4), 189-98.
- Demopoulos, L., Polinsky, M., Steele, G., Mines, D., Blum, M., Caulfield, M., Adamkovic, A., Liu, Q., Harler, M. B., Hahn, C., and Singh, A. (2008). Reduced risk of cytomegalovirus infection in solid organ transplant recipients treated with sirolimus: a pooled analysis of clinical trials. *Transplant Proc* **40**(5), 1407-10.
- Dolan, A., Cunningham, C., Hector, R. D., Hassan-Walker, A. F., Lee, L., Addison, C., Dargan, D. J., McGeoch, D. J., Gatherer, D., Emery, V. C., Griffiths, P. D., Sinzger, C., McSharry, B. P., Wilkinson, G. W., and Davison, A. J. (2004). Genetic content of wild-type human cytomegalovirus. *J Gen Virol* **85**(Pt 5), 1301-12.
- Dondorp, A. M., Nosten, F., Yi, P., Das, D., Phyto, A. P., Tarning, J., Lwin, K. M., Arley, F., Hanpithakpong, W., Lee, S. J., Ringwald, P., Silamut, K., Imwong, M., Chotivanich, K., Lim, P., Herdman, T., An, S. S., Yeung, S., Singhasivanon, P., Day, N. P., Lindegardh, N., Socheat, D., and White, N. J. (2009). Artemisinin resistance in *Plasmodium falciparum* malaria. *N Engl J Med* **361**(5), 455-67.
- Drew, W. L., Anderson, R., Lang, W., Miner, R. C., Davis, G., and Lalezari, J. (1995). Failure of high-dose oral acyclovir to suppress CMV viraemia or induce ganciclovir-resistant CMV in HIV antibody positive patients. *J Acquir Immune Defic Syndr Hum Retrovirol* **8**(3), 289-91.
- Ducancelle, A., Champier, G., Alain, S., Petit, F., Le Pors, M. J., and Mazon, M. C. (2006). A novel mutation in the UL54 gene of human cytomegalovirus isolates that confers resistance to foscarnet. *Antivir Ther* **11**(4), 537-40.
- Ducancelle, A. (2000). Retentissement de mutations du gene de l'AND polymerase du cytomegalovirus humain sur l'activite polymerase et sur la sensibilite du virus aux antiviraux. Thèse Paris VI.

- Dworkin, R. H., Johnson, R. W., Breuer, J., Gnann, J. W., Levin, M. J., Backonja, M., Betts, R. F., Gershon, A. A., Haanpaa, M. L., McKendrick, M. W., Nurmikko, T. J., Oaklander, A. L., Oxman, M. N., Pavan-Langston, D., Petersen, K. L., Rowbotham, M. C., Schmader, K. E., Stacey, B. R., Tyring, S. K., van Wijck, A. J., Wallace, M. S., Wassilew, S. W., and Whitley, R. J. (2007). Recommendations for the management of herpes zoster. *Clin Infect Dis* **44 Suppl 1**, S1-26.
- Eckle, T., Prix, L., Jahn, G., Klingebiel, T., Handgretinger, R., Selle, B., and Hamprecht, K. (2000). Drug-resistant human cytomegalovirus infection in children after allogeneic stem cell transplantation may have different clinical outcomes. *Blood* **96**(9), 3286-9.
- Efferth, T., Marschall, M., Wang, X., Huong, S. M., Hauber, I., Olbrich, A., Kronschnabl, M., Stamminger, T., and Huang, E. S. (2002). Antiviral activity of artesunate towards wild-type, recombinant, and ganciclovir-resistant human cytomegaloviruses. *J Mol Med (Berl)* **80**(4), 233-42.
- Emery, V. C., and Griffiths, P. D. (2000). Prediction of cytomegalovirus load and resistance patterns after antiviral chemotherapy. *Proc Natl Acad Sci U S A* **97**(14), 8039-44.
- English, E. P., Chumanov, R. S., Gellman, S. H., and Compton, T. (2006). Rational development of beta-peptide inhibitors of human cytomegalovirus entry. *J Biol Chem* **281**(5), 2661-7.
- Erice, A., Chou, S., Biron, K. K., Stanat, S. C., Balfour, H. H., Jr., and Jordan, M. C. (1989). Progressive disease due to ganciclovir-resistant cytomegalovirus in immunocompromised patients. *N Engl J Med* **320**(5), 289-93.
- Erice, A., Gil-Roda, C., Perez, J. L., Balfour, H. H., Jr., Sannerud, K. J., Hanson, M. N., Boivin, G., and Chou, S. (1997). Antiviral susceptibilities and analysis of UL97 and DNA polymerase sequences of clinical cytomegalovirus isolates from immunocompromised patients. *J Infect Dis* **175**(5), 1087-92.
- Estep, R. D., Messaoudi, I., and Wong, S. W. Simian herpesviruses and their risk to humans. *Vaccine* **28 Suppl 2**, B78-84.
- Evers, D. L., Chao, C. F., Wang, X., Zhang, Z., Huong, S. M., and Huang, E. S. (2005). Human cytomegalovirus-inhibitory flavonoids: studies on antiviral activity and mechanism of action. *Antiviral Res* **68**(3), 124-34.
- Evers, D. L., Komazin, G., Shin, D., Hwang, D. D., Townsend, L. B., and Drach, J. C. (2002). Interactions among antiviral drugs acting late in the replication cycle of human cytomegalovirus. *Antiviral Res* **56**(1), 61-72.
- Faizi Khan, R., Mori, S., Eizuru, Y., Kumura Ishii, K., and Minamishima, Y. (1998). Genetic analysis of a ganciclovir-resistant human cytomegalovirus mutant. *Antiviral Res* **40**(1-2), 95-103.
- Faulds, D., and Heel, R. C. (1990). Ganciclovir. A review of its antiviral activity, pharmacokinetic properties and therapeutic efficacy in cytomegalovirus infections. *Drugs* **39**(4), 597-638.
- Fillet, A. M., Auray, L., Alain, S., Gourelain, K., Imbert, B. M., Najioullah, F., Champier, G., Gouarin, S., Carquin, J., Houhou, N., Garrigue, I., Ducancelle, A., Thouvenot, D., and Mazon, M. C. (2004). Natural polymorphism of cytomegalovirus DNA polymerase lies in two nonconserved regions located between domains delta-C and II and between domains III and I. *Antimicrob Agents Chemother* **48**(5), 1865-8.



- Fishman, J. A., and Rubin, R. H. (1998). Infection in organ-transplant recipients. *N Engl J Med* **338**(24), 1741-51.
- Formica, J. V., and Regelson, W. (1995). Review of the biology of Quercetin and related bioflavonoids. *Food Chem Toxicol* **33**(12), 1061-80.
- Frey, S. E., Harrison, C., Pass, R. F., Yang, E., Boken, D., Sekulovich, R. E., Percell, S., Izu, A. E., Hirabayashi, S., Burke, R. L., and Duliege, A. M. (1999). Effects of antigen dose and immunization regimens on antibody responses to a cytomegalovirus glycoprotein B subunit vaccine. *J Infect Dis* **180**(5), 1700-3.
- Gabor, M. (1986). Anti-inflammatory and anti-allergic properties of flavonoids. *Prog Clin Biol Res* **213**, 471-80.
- Gandhi, M. K., and Khanna, R. (2004). Human cytomegalovirus: clinical aspects, immune regulation, and emerging treatments. *Lancet Infect Dis* **4**(12), 725-38.
- Gaytant, M. A., Rours, G. I., Steegers, E. A., Galama, J. M., and Semmekrot, B. A. (2003). Congenital cytomegalovirus infection after recurrent infection: case reports and review of the literature. *Eur J Pediatr* **162**(4), 248-53.
- Gerna, G., Baldanti, F., and Revello, M. G. (2004). Pathogenesis of human cytomegalovirus infection and cellular targets. *Hum Immunol* **65**(5), 381-6.
- Gerna, G., Zavattoni, M., Baldanti, F., Furione, M., Chezzi, L., Revello, M. G., and Percivalle, E. (1998). Circulating cytomegalic endothelial cells are associated with high human cytomegalovirus (HCMV) load in AIDS patients with late-stage disseminated HCMV disease. *J Med Virol* **55**(1), 64-74.
- Gérard, L., Salmon, D. (1999). Thérapeutique. Les herpèsvirus humains. Elsevier. Paris. 1ère Ed.
- Gershburg, E., Hong, K., and Pagano, J. S. (2004). Effects of maribavir and selected indolocarbazoles on Epstein-Barr virus protein kinase BGLF4 and on viral lytic replication. *Antimicrob Agents Chemother* **48**(5), 1900-3.
- Gilbert, C., and Boivin, G. (2005). New reporter cell line to evaluate the sequential emergence of multiple human cytomegalovirus mutations during in vitro drug exposure. *Antimicrob Agents Chemother* **49**(12), 4860-6.
- Glasgow, L. A., Richards, J. T., and Kern, E. R. (1982). Effect of acyclovir treatment on acute and chronic murine cytomegalovirus infection. *Am J Med* **73**(1A), 132-7.
- Gohring, K., Mikeler, E., Jahn, G., Rohde, F., and Hamprecht, K. (2008). Rapid semiquantitative real-time PCR for the detection of human cytomegalovirus UL97 mutations conferring ganciclovir resistance. *Antivir Ther* **13**(3), 461-6.
- Gouarin, S., Gault, E., Vabret, A., Cointe, D., Rozenberg, F., Grangeot-Keros, L., Barjot, P., Garbarg-Chenon, A., Lebon, P., and Freymuth, F. (2002). Real-time PCR quantification of human cytomegalovirus DNA in amniotic fluid samples from mothers with primary infection. *J Clin Microbiol* **40**(5), 1767-72.
- Griffiths, P. D. (2001). Cytomegalovirus therapy: current constraints and future opportunities. *Curr Opin Infect Dis* **14**(6), 765-8.

- Hall, J. D., Orth, K. L., Sander, K. L., Swihart, B. M., and Senese, R. A. (1995). Mutations within conserved motifs in the 3'-5' exonuclease domain of herpes simplex virus DNA polymerase. *J Gen Virol* **76** ( Pt 12), 2999-3008.
- Hallenberger, S. (2004). Antiviral therapies. *J Clin Virol* **30 Suppl 1**, S23-5.
- Hamirally, S., Kamil, J. P., Ndassa-Colday, Y. M., Lin, A. J., Jahng, W. J., Baek, M. C., Noton, S., Silva, L. A., Simpson-Holley, M., Knipe, D. M., Golan, D. E., Marto, J. A., and Coen, D. M. (2009). Viral mimicry of Cdc2/cyclin-dependent kinase 1 mediates disruption of nuclear lamina during human cytomegalovirus nuclear egress. *PLoS Pathog* **5**(1), e1000275.
- Hanks, S. K., Quinn, A. M., and Hunter, T. (1988). The protein kinase family: conserved features and deduced phylogeny of the catalytic domains. *Science* **241**(4861), 42-52.
- Hanson, M. N., Preheim, L. C., Chou, S., Talarico, C. L., Biron, K. K., and Erice, A. (1995). Novel mutation in the UL97 gene of a clinical cytomegalovirus strain conferring resistance to ganciclovir. *Antimicrob Agents Chemother* **39**(5), 1204-5.
- Hantz, S. (2009). Résistance du cytomegalovirus aux antiviraux : de la Clinique à la structure. Thèse n°41-2009.
- Hartline, C. B., Gustin, K. M., Wan, W. B., Ciesla, S. L., Beadle, J. R., Hostetler, K. Y., and Kern, E. R. (2005). Ether lipid-ester prodrugs of acyclic nucleoside phosphonates: activity against adenovirus replication in vitro. *J Infect Dis* **191**(3), 396-9.
- Hayashi, K., Hayashi, T., Otsuka, H., and Takeda, Y. (1997). Antiviral activity of 5,6,7-trimethoxyflavone and its potentiation of the antiherpes activity of acyclovir. *J Antimicrob Chemother* **39**(6), 821-4.
- He, Z., He, Y. S., Kim, Y., Chu, L., Ohmstede, C., Biron, K. K., and Coen, D. M. (1997). The human cytomegalovirus UL97 protein is a protein kinase that autophosphorylates on serines and threonines. *J Virol* **71**(1), 405-11.
- Heineman, T. C., Schleiss, M., Bernstein, D. I., Spaete, R. R., Yan, L., Duke, G., Prichard, M., Wang, Z., Yan, Q., Sharp, M. A., Klein, N., Arvin, A. M., and Kemble, G. (2006). A phase 1 study of 4 live, recombinant human cytomegalovirus Towne/Toledo chimeric vaccines. *J Infect Dis* **193**(10), 1350-60.
- Herget, T., Freitag, M., Morbitzer, M., Kupfer, R., Stamminger, T., and Marschall, M. (2004). Novel chemical class of pUL97 protein kinase-specific inhibitors with strong anticytomegaloviral activity. *Antimicrob Agents Chemother* **48**(11), 4154-62.
- Herget, T., Marschall, M. (2006). Recent developments in anti-herpesviral therapy based on protein kinase inhibitors, xviii. In: E. Bogner and A. Holzenburg. Editors. *New Concepts of Antiviral Therapy*. Springer. Dordrecht. the Netherlands 538 pp.
- Hill, J. A., Hummel, M., Starling, R. C., Kobashigawa, J. A., Perrone, S. V., Arizon, J. M., Simonsen, S., Abeywickrama, K. H., and Bara, C. (2007). A lower incidence of cytomegalovirus infection in de novo heart transplant recipients randomized to everolimus. *Transplantation* **84**(11), 1436-42.
- Hirt, B. (1967). Selective extraction of polyoma DNA from infected mouse cell cultures. *J Mol Biol* **26**(2), 365-9.

- Hitchcock, M. J., Jaffe, H. S., Martin, J. C., Stagg, R. J. (1996). Cidofovir, a new agent with potent anti-herpesvirus activity. *Antivir Chem Chemother* **7**, 115-27.
- Ho, M. (1991). *Cytomegalovirus: Biology and Infection*, 2<sup>nd</sup> Ed. New York. Plenum Publishing.
- Hostetler, K. Y. (2009). Alkoxyalkyl prodrugs of acyclic nucleoside phosphonates enhance oral antiviral activity and reduce toxicity: current state of the art. *Antiviral Res* **82**(2), A84-98.
- Hostetler, K. Y., Beadle, J. R., Kini, G. D., Gardner, M. F., Wright, K. N., Wu, T. H., and Korba, B. A. (1997). Enhanced oral absorption and antiviral activity of 1-O-octadecyl-sn-glycero-3-phospho-acyclovir and related compounds in hepatitis B virus infection, in vitro. *Biochem Pharmacol* **53**(12), 1815-22.
- Hostetler, K. Y., Rybak, R. J., Beadle, J. R., Gardner, M. F., Aldern, K. A., Wright, K. N., and Kern, E. R. (2001). In vitro and in vivo activity of 1-O-hexadecylpropanediol-3-phospho-ganciclovir and 1-O-hexadecylpropanediol-3-phospho-penciclovir in cytomegalovirus and herpes simplex virus infections. *Antivir Chem Chemother* **12**(1), 61-70.
- Humar, A., Kumar, D., Preiksaitis, J., Boivin, G., Siegal, D., Fenton, J., Jackson, K., Nia, S., and Lien, D. (2005). A trial of valganciclovir prophylaxis for cytomegalovirus prevention in lung transplant recipients. *Am J Transplant* **5**(6), 1462-8.
- Humar, A., Lebranchu, Y., Vincenti, F., Blumberg, E. A., Punch, J. D., Limaye, A. P., Abramowicz, D., Jardine, A. G., Voulgari, A. T., Ives, J., Hauser, I. A., and Peeters, P. The efficacy and safety of 200 days valganciclovir cytomegalovirus prophylaxis in high-risk kidney transplant recipients. *Am J Transplant* **10**(5), 1228-37.
- Humar, A., Peeters, P., Abramowicz, D., Lebranchu, Y., Hauser, I., Jardine, A., Limaye, A. P., Vincenti, F., Punch, J. D., and Blumberg, E. Response to questions regarding the design and results of the IMPACT trial. *Am J Transplant* **11**(1), 177-8.
- Hume, A. J., Finkel, J. S., Kamil, J. P., Coen, D. M., Culbertson, M. R., and Kalejta, R. F. (2008). Phosphorylation of retinoblastoma protein by viral protein with cyclin-dependent kinase function. *Science* **320**(5877), 797-9.
- Imbert, B. M. (2002). *Epidémiologie des infections à cytomegalovirus*. Edition Scientifique et médicales. Elsevier. Paris Collection Medi/Bio: 43-50
- Jabs, D. A., Enger, C., Dunn, J. P., and Forman, M. (1998). Cytomegalovirus retinitis and viral resistance: ganciclovir resistance. CMV Retinitis and Viral Resistance Study Group. *J Infect Dis* **177**(3), 770-3.
- Jabs, D. A., Gilpin, A. M., Min, Y. I., Erice, A., Kempen, J. H., and Quinn, T. C. (2002). HIV and cytomegalovirus viral load and clinical outcomes in AIDS and cytomegalovirus retinitis patients: Monoclonal Antibody Cytomegalovirus Retinitis Trial. *AIDS* **16**(6), 877-87.
- Jacobson, M. A. (1994). Current management of cytomegalovirus disease in patients with AIDS. *AIDS Res Hum Retroviruses* **10**(8), 917-23.
- Jobling, S. A., and Gehrke, L. (1987). Enhanced translation of chimaeric messenger RNAs containing a plant viral untranslated leader sequence. *Nature* **325**(6105), 622-5.
- Johnson, R. A., Wang, X., Ma, X. L., Huong, S. M., and Huang, E. S. (2001). Human cytomegalovirus up-regulates the phosphatidylinositol 3-kinase (PI3-K) pathway: inhibition of PI3-K activity inhibits viral replication and virus-induced signaling. *J Virol* **75**(13), 6022-32.

- Jones, T. R., Lee, S. W., Johann, S. V., Razinkov, V., Visalli, R. J., Feld, B., Bloom, J. D., and O'Connell, J. (2004). Specific inhibition of human cytomegalovirus glycoprotein B-mediated fusion by a novel thiourea small molecule. *J Virol* **78**(3), 1289-300.
- Kamil, J. P., and Coen, D. M. (2007). Human cytomegalovirus protein kinase UL97 forms a complex with the tegument phosphoprotein pp65. *J Virol* **81**(19), 10659-68.
- Kaptein, S. J., Efferth, T., Leis, M., Rechter, S., Auerochs, S., Kalmer, M., Bruggeman, C. A., Vink, C., Stamminger, T., and Marschall, M. (2006). The anti-malaria drug artesunate inhibits replication of cytomegalovirus in vitro and in vivo. *Antiviral Res* **69**(2), 60-9.
- Karavellas, M. P., Plummer, D. J., Macdonald, J. C., Torriani, F. J., Shufelt, C. L., Azen, S. P., and Freeman, W. R. (1999). Incidence of immune recovery vitritis in cytomegalovirus retinitis patients following institution of successful highly active antiretroviral therapy. *J Infect Dis* **179**(3), 697-700.
- Karlin, S., Mocarski, E. S., and Schachtel, G. A. (1994). Molecular evolution of herpesviruses: genomic and protein sequence comparisons. *J Virol* **68**(3), 1886-902.
- Keith, K. A., Wan, W. B., Ciesla, S. L., Beadle, J. R., Hostetler, K. Y., and Kern, E. R. (2004). Inhibitory activity of alkoxyalkyl and alkyl esters of cidofovir and cyclic cidofovir against orthopoxvirus replication in vitro. *Antimicrob Agents Chemother* **48**(5), 1869-71.
- Kemper, B., Garabett, M., and Courage, U. (1981). Studies on the function of gene 49 controlled endonuclease of phage T4 (endonuclease VII). *Prog Clin Biol Res* **64**, 151-66.
- Kemper, B., and Janz, E. (1976). Function of gene 49 of bacteriophage T4. I. Isolation and biochemical characterization of very fast-sedimenting DNA. *J Virol* **18**(3), 992-9.
- Kenneson, A., and Cannon, M. J. (2007). Review and meta-analysis of the epidemiology of congenital cytomegalovirus (CMV) infection. *Rev Med Virol* **17**(4), 253-76.
- Kern, E. R. (1991). Value of animal models to evaluate agents with potential activity against human cytomegalovirus. *Transplant Proc* **23**(3 Suppl 3), 152-5, discussion 155.
- Kern, E. R., Collins, D. J., Wan, W. B., Beadle, J. R., Hostetler, K. Y., and Quenelle, D. C. (2004). Oral treatment of murine cytomegalovirus infections with ether lipid esters of cidofovir. *Antimicrob Agents Chemother* **48**(9), 3516-22.
- Kern, E. R., Kushner, N. L., Hartline, C. B., Williams-Aziz, S. L., Harden, E. A., Zhou, S., Zemlicka, J., and Prichard, M. N. (2005). In vitro activity and mechanism of action of methylenecyclopropane analogs of nucleosides against herpesvirus replication. *Antimicrob Agents Chemother* **49**(3), 1039-45.
- Kern, E. R., Rybak, R. J., Hartline, C. B., and Bidanset, D. J. (2001). Predictive efficacy of SCID-hu mouse models for treatment of human cytomegalovirus infections. *Antivir Chem Chemother* **12 Suppl 1**, 149-56.
- Khoury, J. A., Storch, G. A., Bohl, D. L., Schuessler, R. M., Torrence, S. M., Lockwood, M., Gaudreault-Keener, M., Koch, M. J., Miller, B. W., Hardinger, K. L., Schnitzler, M. A., and Brennan, D. C. (2006). Prophylactic versus preemptive oral valganciclovir for the management of cytomegalovirus infection in adult renal transplant recipients. *Am J Transplant* **6**(9), 2134-43.

- Kliem, V., Fricke, L., Wollbrink, T., Burg, M., Radermacher, J., and Rohde, F. (2008). Improvement in long-term renal graft survival due to CMV prophylaxis with oral ganciclovir: results of a randomized clinical trial. *Am J Transplant* **8**(5), 975-83.
- Komazin, G., Townsend, L. B., and Drach, J. C. (2004). Role of a mutation in human cytomegalovirus gene UL104 in resistance to benzimidazole ribonucleosides. *J Virol* **78**(2), 710-5.
- Kondo, K., Kaneshima, H., and Mocarski, E. S. (1994). Human cytomegalovirus latent infection of granulocyte-macrophage progenitors. *Proc Natl Acad Sci U S A* **91**(25), 11879-83.
- Konoplev, S., Champlin, R. E., Giralt, S., Ueno, N. T., Khouri, I., Raad, I., Rolston, K., Jacobson, K., Tarrand, J., Luna, M., Nguyen, Q., and Whimbey, E. (2001). Cytomegalovirus pneumonia in adult autologous blood and marrow transplant recipients. *Bone Marrow Transplant* **27**(8), 877-81.
- Koszalka, G. W., Johnson, N. W., Good, S. S., Boyd, L., Chamberlain, S. C., Townsend, L. B., Drach, J. C., and Biron, K. K. (2002). Preclinical and toxicology studies of 1263W94, a potent and selective inhibitor of human cytomegalovirus replication. *Antimicrob Agents Chemother* **46**(8), 2373-80.
- Kouzarides, T., Bankier, A. T., Satchwell, S. C., Weston, K., Tomlinson, P., Barrell, B. G. (1987). Sequence and transcription analysis of the human cytomegalovirus DNA polymerase gene. *J Virol* **61**(1), 125-33.
- Krosky, P. M., Baek, M. C., and Coen, D. M. (2003). The human cytomegalovirus UL97 protein kinase, an antiviral drug target, is required at the stage of nuclear egress. *J Virol* **77**(2), 905-14.
- Krosky, P. M., Borysko, K. Z., Nassiri, M. R., Devivar, R. V., Ptak, R. G., Davis, M. G., Biron, K. K., Townsend, L. B., and Drach, J. C. (2002). Phosphorylation of beta-D-riboseylbenzimidazoles is not required for activity against human cytomegalovirus. *Antimicrob Agents Chemother* **46**(2), 478-86.
- Krosky, P. M., Underwood, M. R., Turk, S. R., Feng, K. W., Jain, R. K., Ptak, R. G., Westerman, A. C., Biron, K. K., Townsend, L. B., and Drach, J. C. (1998). Resistance of human cytomegalovirus to benzimidazole ribonucleosides maps to two open reading frames: UL89 and UL56. *J Virol* **72**(6), 4721-8.
- Kudchodkar, S. B., Yu, Y., Maguire, T. G., and Alwine, J. C. (2004). Human cytomegalovirus infection induces rapamycin-insensitive phosphorylation of downstream effectors of mTOR kinase. *J Virol* **78**(20), 11030-9.
- Kuijpers, T. W., Vossen, M. T., Gent, M. R., Davin, J. C., Roos, M. T., Wertheim-van Dillen, P. M., Weel, J. F., Baars, P. A., and van Lier, R. A. (2003). Frequencies of circulating cytolytic, CD45RA+CD27-, CD8+ T lymphocytes depend on infection with CMV. *J Immunol* **170**(8), 4342-8.
- Kushner, N. L., Williams, S. L., Hartline, C. B., Harden, E. A., Bidanset, D. J., Chen, X., Zemlicka, J., and Kern, E. R. (2003). Efficacy of methylenecyclopropane analogs of nucleosides against herpesvirus replication in vitro. *Nucleosides Nucleotides Nucleic Acids* **22**(12), 2105-19.
- Lalezari, J. P., Aberg, J. A., Wang, L. H., Wire, M. B., Miner, R., Snowden, W., Talarico, C. L., Shaw, S., Jacobson, M. A., and Drew, W. L. (2002). Phase I dose escalation trial evaluating the pharmacokinetics, anti-human cytomegalovirus (HCMV) activity, and safety of 1263W94 in human immunodeficiency virus-infected men with asymptomatic HCMV shedding. *Antimicrob Agents Chemother* **46**(9), 2969-76.

- Lalezari, J. P., Stagg, R. J., Kuppermann, B. D., Holland, G. N., Kramer, F., Ives, D. V., Youle, M., Robinson, M. R., Drew, W. L., and Jaffe, H. S. (1997). Intravenous cidofovir for peripheral cytomegalovirus retinitis in patients with AIDS. A randomized, controlled trial. *Ann Intern Med* **126**(4), 257-63.
- Lau, P. K., Woods, M. L., Ratanjee, S. K., and John, G. T. Artesunate is ineffective in controlling valganciclovir-resistant cytomegalovirus infection. *Clin Infect Dis* **52**(2), 279.
- Legendre, C. M. (2002). Traitement de l'infection à CMV chez le receveur de greffe d'organe. *Cytomégalovirus*. Marie-Christine Mazon. Elsevier Guides Médi BIO. 185-91.
- Leung, D. T., and Sacks, S. L. (2000). Current recommendations for the treatment of genital herpes. *Drugs* **60**(6), 1329-52.
- Li, S. B., Yang, Z. H., Feng, J. S., Fong, C. K., Lucia, H. L., and Hsiung, G. D. (1990). Activity of (S)-1-(3-hydroxy-2-phosphonylmethoxypropyl)cytosine (HPMPC) against guinea pig cytomegalovirus infection in cultured cells and in guinea pigs. *Antiviral Res* **13**(5), 237-52.
- Limaye, A. P., Raghu, G., Koelle, D. M., Ferrenberg, J., Huang, M. L., and Boeckh, M. (2002). High incidence of ganciclovir-resistant cytomegalovirus infection among lung transplant recipients receiving preemptive therapy. *J Infect Dis* **185**(1), 20-7.
- Lin, A., Xu, H., and Yan, W. (2007). Modulation of HLA expression in human cytomegalovirus immune evasion. *Cell Mol Immunol* **4**(2), 91-8.
- Lischka, P., Hewlett, G., Wunberg, T., Baumeister, J., Paulsen, D., Goldner, T., Ruebsamen-Schaeff, H., and Zimmermann, H. In vitro and in vivo activities of the novel anticytomegalovirus compound AIC246. *Antimicrob Agents Chemother* **54**(3), 1290-7.
- Littler, E., Stuart, A. D., and Chee, M. S. (1992). Human cytomegalovirus UL97 open reading frame encodes a protein that phosphorylates the antiviral nucleoside analogue ganciclovir. *Nature* **358**(6382), 160-2.
- Liu, S., Knafels, J. D., Chang, J. S., Waszak, G. A., Baldwin, E. T., Deibel, M. R., Jr., Thomsen, D. R., Homa, F. L., Wells, P. A., Tory, M. C., Poorman, R. A., Gao, H., Qiu, X., and Seddon, A. P. (2006). Crystal structure of the herpes simplex virus 1 DNA polymerase. *J Biol Chem* **281**(26), 18193-200.
- Ljungman, P., de La Camara, R., Milpied, N., Volin, L., Russell, C. A., Crisp, A., and Webster, A. (2002). Randomized study of valacyclovir as prophylaxis against cytomegalovirus reactivation in recipients of allogeneic bone marrow transplants. *Blood* **99**(8), 3050-6.
- Loregian, A., Appleton, B. A., Hogle, J. M., and Coen, D. M. (2004). Specific residues in the connector loop of the human cytomegalovirus DNA polymerase accessory protein UL44 are crucial for interaction with the UL54 catalytic subunit. *J Virol* **78**(17), 9084-92.
- Lorenzi, P. L., Landowski, C. P., Brancale, A., Song, X., Townsend, L. B., Drach, J. C., and Amidon, G. L. (2006). N-methylpurine DNA glycosylase and 8-oxoguanine dna glycosylase metabolize the antiviral nucleoside 2-bromo-5,6-dichloro-1-(beta-D-ribofuranosyl)benzimidazole. *Drug Metab Dispos* **34**(6), 1070-7.

- Lowance, D., Neumayer, H. H., Legendre, C. M., Squifflet, J. P., Kovarik, J., Brennan, P. J., Norman, D., Mendez, R., Keating, M. R., Coggon, G. L., Crisp, A., and Lee, I. C. (1999). Valacyclovir for the prevention of cytomegalovirus disease after renal transplantation. International Valacyclovir Cytomegalovirus Prophylaxis Transplantation Study Group. *N Engl J Med* **340**(19), 1462-70.
- Lurain, N. S., Bhorade, S. M., Pursell, K. J., Avery, R. K., Yeldandi, V. V., Isada, C. M., Robert, E. S., Kohn, D. J., Arens, M. Q., Garrity, E. R., Taeye, A. J., Mullen, M. G., Todd, K. M., Bremer, J. W., and Yen-Lieberman, B. (2002). Analysis and characterization of antiviral drug-resistant cytomegalovirus isolates from solid organ transplant recipients. *J Infect Dis* **186**(6), 760-8.
- Lurain, N. S., and Chou, S. Antiviral drug resistance of human cytomegalovirus. *Clin Microbiol Rev* **23**(4), 689-712.
- Lurain, N. S., Spafford, L. E., and Thompson, K. D. (1994). Mutation in the UL97 open reading frame of human cytomegalovirus strains resistant to ganciclovir. *J Virol* **68**(7), 4427-31.
- Lurain, N. S., Thompson, K. D., Holmes, E. W., and Read, G. S. (1992). Point mutations in the DNA polymerase gene of human cytomegalovirus that result in resistance to antiviral agents. *J Virol* **66**(12), 7146-52.
- Ma, J. D., Nafziger, A. N., Villano, S. A., Gaedigk, A., and Bertino, J. S., Jr. (2006). Maribavir pharmacokinetics and the effects of multiple-dose maribavir on cytochrome P450 (CYP) 1A2, CYP 2C9, CYP 2C19, CYP 2D6, CYP 3A, N-acetyltransferase-2, and xanthine oxidase activities in healthy adults. *Antimicrob Agents Chemother* **50**(4), 1130-5.
- Marfori, J. E., Exner, M. M., Marousek, G. I., Chou, S., and Drew, W. L. (2007). Development of new cytomegalovirus UL97 and DNA polymerase mutations conferring drug resistance after valganciclovir therapy in allogeneic stem cell recipients. *J Clin Virol* **38**(2), 120-5.
- Marschall, M., Freitag, M., Suchy, P., Romaker, D., Kupfer, R., Hanke, M., and Stamminger, T. (2003). The protein kinase pUL97 of human cytomegalovirus interacts with and phosphorylates the DNA polymerase processivity factor pUL44. *Virology* **311**(1), 60-71.
- Marschall, M., Marzi, A., aus dem Siepen, P., Jochmann, R., Kalmer, M., Auerochs, S., Lischka, P., Leis, M., and Stamminger, T. (2005). Cellular p32 recruits cytomegalovirus kinase pUL97 to redistribute the nuclear lamina. *J Biol Chem* **280**(39), 33357-67.
- Marschall, M., Stein-Gerlach, M., Freitag, M., Kupfer, R., van Den Bogaard, M., and Stamminger, T. (2001). Inhibitors of human cytomegalovirus replication drastically reduce the activity of the viral protein kinase pUL97. *J Gen Virol* **82**(Pt 6), 1439-50.
- Marschall, M., Stein-Gerlach, M., Freitag, M., Kupfer, R., van den Bogaard, M., and Stamminger, T. (2002). Direct targeting of human cytomegalovirus protein kinase pUL97 by kinase inhibitors is a novel principle for antiviral therapy. *J Gen Virol* **83**(Pt 5), 1013-23.
- Martin, M., Goyette, N., and Boivin, G. Contrasting effects on ganciclovir susceptibility and replicative capacity of two mutations at codon 466 of the human cytomegalovirus UL97 gene. *J Clin Virol* **49**(4), 296-8.
- Marty, F. M., Bryar, J., Browne, S. K., Schwarzberg, T., Ho, V. T., Bassett, I. V., Koreth, J., Alyea, E. P., Soiffer, R. J., Cutler, C. S., Antin, J. H., and Baden, L. R. (2007). Sirolimus-based graft-versus-host disease prophylaxis protects against cytomegalovirus reactivation after allogeneic hematopoietic stem cell transplantation: a cohort analysis. *Blood* **110**(2), 490-500.

- Mazeron, M. C., Alain, S., Leruez-Ville, M., Schnepf, N. (2009). Infections à cytomégalo­virus. In: EMC. Paris: Elsevier Masson SAS. 8-052-C-10.
- McGeoch, D. J., Cook, S., Dolan, A., Jamieson, F. E., and Telford, E. A. (1995). Molecular phylogeny and evolutionary timescale for the family of mammalian herpesviruses. *J Mol Biol* **247**(3), 443-58.
- McGeoch, D. J., Rixon, F. J., and Davison, A. J. (2006). Topics in herpesvirus genomics and evolution. *Virus Res* **117**(1), 90-104.
- McSharry, J. J., McDonough, A., Olson, B., Hallenberger, S., Reefs­chlaeger, J., Bender, W., and Drusano, G. L. (2001). Susceptibilities of human cytomegalovirus clinical isolates to BAY38-4766, BAY43-9695, and ganciclovir. *Antimicrob Agents Chemother* **45**(10), 2925-7.
- McSharry, J. J., McDonough, A., Olson, B., Talarico, C., Davis, M., and Biron, K. K. (2001). Inhibition of ganciclovir-susceptible and -resistant human cytomegalovirus clinical isolates by the benzimidazole L-ribose 1263W94. *Clin Diagn Lab Immunol* **8**(6), 1279-81.
- McVoy, M. A., and Adler, S. P. (1994). Human cytomegalovirus DNA replicates after early circularization by concatemer formation, and inversion occurs within the concatemer. *J Virol* **68**(2), 1040-51.
- McVoy, M. A., and Nixon, D. E. (2005). 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* **79**(17), 11115-27.
- McVoy, M. A., Nixon, D. E., Hur, J. K., and Adler, S. P. (2000). The ends on herpesvirus DNA replicative concatemers contain pac2 cis cleavage/packaging elements and their formation is controlled by terminal cis sequences. *J Virol* **74**(3), 1587-92.
- Meiselman, M. S., Cello, J. P., and Margaretten, W. (1985). Cytomegalovirus colitis. Report of the clinical, endoscopic, and pathologic findings in two patients with the acquired immune deficiency syndrome. *Gastroenterology* **88**(1 Pt 1), 171-5.
- Mendes, A. V., Benard, G., Pereira, C. B., Kallas, E. G., Duarte, A. J., Pannuti, C. S., Dulley, F. L., and Machado, C. M. (2002). Different kinetics in anti-cytomegalovirus immunity reconstitution evaluated by lymphocyte proliferation and IFN-gamma production in allogeneic and autologous bone marrow transplantation. *Acta Haematol* **107**(4), 187-94.
- Mercorelli, B., Sinigalia, E., Loregian, A., and Palu, G. (2008). Human cytomegalovirus DNA replication: antiviral targets and drugs. *Rev Med Virol* **18**(3), 177-210.
- Mhaske, S. B., Ksebati, B., Prichard, M. N., Drach, J. C., and Zemlicka, J. (2009). Phosphonate analogues of cyclopropavir phosphates and their E-isomers. Synthesis and antiviral activity. *Bioorg Med Chem* **17**(11), 3892-9.
- Michel, D., Hohn, S., Haller, T., Jun, D., and Mertens, T. (2001). Aciclovir selects for ganciclovir-cross-resistance of human cytomegalovirus in vitro that is only in part explained by known mutations in the UL97 protein. *J Med Virol* **65**(1), 70-6.
- Michel, D., Kramer, S., Hohn, S., Schaarschmidt, P., Wunderlich, K., and Mertens, T. (1999). Amino acids of conserved kinase motifs of cytomegalovirus protein UL97 are essential for autophosphorylation. *J Virol* **73**(10), 8898-901.



- Michel, D., and Mertens, T. (2004). The UL97 protein kinase of human cytomegalovirus and homologues in other herpesviruses: impact on virus and host. *Biochim Biophys Acta* **1697**(1-2), 169-80.
- Michel, D., Pavic, I., Zimmermann, A., Haupt, E., Wunderlich, K., Heuschmid, M., and Mertens, T. (1996). The UL97 gene product of human cytomegalovirus is an early-late protein with a nuclear localization but is not a nucleoside kinase. *J Virol* **70**(9), 6340-6.
- Michel, D., Schaarschmidt, P., Wunderlich, K., Heuschmid, M., Simoncini, L., Muhlberger, D., Zimmermann, A., Pavic, I., and Mertens, T. (1998). Functional regions of the human cytomegalovirus protein pUL97 involved in nuclear localization and phosphorylation of ganciclovir and pUL97 itself. *J Gen Virol* **79** ( Pt 9), 2105-12.
- Middleton, E., Jr., Kandaswami, C., and Theoharides, T. C. (2000). The effects of plant flavonoids on mammalian cells: implications for inflammation, heart disease, and cancer. *Pharmacol Rev* **52**(4), 673-751.
- Milpied, N. (2002). Traitement de la maladie à cytomegalovirus et greffe de moelle. *Cytomégalovirus*. Marie-Christine Mazon. Elsevier Guides Médi Bio. 169-83.
- Mitchell, D. K., Holmes, S. J., Burke, R. L., Duliege, A. M., and Adler, S. P. (2002). Immunogenicity of a recombinant human cytomegalovirus gB vaccine in seronegative toddlers. *Pediatr Infect Dis J* **21**(2), 133-8.
- Mitrocotsa, D., Mitaku, S., Axarlis, S., Harvala, C., and Malamas, M. (2000). Evaluation of the antiviral activity of kaempferol and its glycosides against human cytomegalovirus. *Planta Med* **66**(4), 377-9.
- Mocarski, E. S., Shenk, T., Pass, R. F. (2007). Cytomegaloviruses. In: Knipe, D. M., Howley, P. M. Editors. *Fields Virology*. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins, 2701-72
- Moore, P. S., Gao, S. J., Dominguez, G., Cesarman, E., Lungu, O., Knowles, D. M., Garber, R., Pellett, P. E., McGeoch, D. J., and Chang, Y. (1996). Primary characterization of a herpesvirus agent associated with Kaposi's sarcoma. *J Virol* **70**(1), 549-58.
- Mousavi-Jazi, M., Schloss, L., Drew, W. L., Linde, A., Miner, R. C., Harmenberg, J., Wahren, B., and Brytting, M. (2001). Variations in the cytomegalovirus DNA polymerase and phosphotransferase genes in relation to foscarnet and ganciclovir sensitivity. *J Clin Virol* **23**(1-2), 1-15.
- Orlikowski, D., Porcher, R., Sivadon-Tardy, V., Quincampoix, J. C., Raphael, J. C., Durand, M. C., Sharshar, T., Roussi, J., Caudie, C., Annane, D., Rozenberg, F., Leruez-Ville, M., Gaillard, J. L., and Gault, E. Guillain-Barre syndrome following primary cytomegalovirus infection: a prospective cohort study. *Clin Infect Dis* **52**(7), 837-44.
- Ozaki, K. S., Camara, N. O., Nogueira, E., Pereira, M. G., Granato, C., Melaragno, C., Camargo, L. F., and Pacheco-Silva, A. (2007). The use of sirolimus in ganciclovir-resistant cytomegalovirus infections in renal transplant recipients. *Clin Transplant* **21**(5), 675-80.
- Painter, G. R., and Hostetler, K. Y. (2004). Design and development of oral drugs for the prophylaxis and treatment of smallpox infection. *Trends Biotechnol* **22**(8), 423-7.
- Painter, R. G., Trost, C. L., Lampert, M. B., Almond, R. M., Buller, M., Kern, E., Painter, G. P., Robertson, A. T., Frazer, N., O'Mahony, R. (2008). CMX001. Anti-smallpox agent, anti-cytomegalovirus agent, viral polymerase inhibitor. *DrugsFut*. **33**(8) 655.

- Parker, S., Handley, L., and Buller, R. M. (2008). Therapeutic and prophylactic drugs to treat orthopoxvirus infections. *Future Virol* **3**(6), 595-612.
- Pass, R. F. (2005). Congenital cytomegalovirus infection and hearing loss. *Herpes* **12**(2), 50-5.
- Pass, R. F., Zhang, C., Evans, A., Simpson, T., Andrews, W., Huang, M. L., Corey, L., Hill, J., Davis, E., Flanigan, C., and Cloud, G. (2009). Vaccine prevention of maternal cytomegalovirus infection. *N Engl J Med* **360**(12), 1191-9.
- Paya, C., Humar, A., Dominguez, E., Washburn, K., Blumberg, E., Alexander, B., Freeman, R., Heaton, N., and Pescovitz, M. D. (2004). Efficacy and safety of valganciclovir vs. oral ganciclovir for prevention of cytomegalovirus disease in solid organ transplant recipients. *Am J Transplant* **4**(4), 611-20.
- Plotkin, S. A. (2004). Congenital cytomegalovirus infection and its prevention. *Clin Infect Dis* **38**(7), 1038-9.
- Pouteil-Noble, C., Ecochard, R., Landrison, G., Donia-Maged, A., Tardy, J. C., Bosshard, S., Colon, S., Betuel, H., Aymard, M., and Touraine, J. L. (1993). Cytomegalovirus infection--an etiological factor for rejection? A prospective study in 242 renal transplant patients. *Transplantation* **55**(4), 851-7.
- Prichard, M. N. (2009). Function of human cytomegalovirus UL97 kinase in viral infection and its inhibition by maribavir. *Rev Med Virol* **19**(4), 215-29.
- Prichard, M. N., Britt, W. J., Daily, S. L., Hartline, C. B., and Kern, E. R. (2005). Human cytomegalovirus UL97 Kinase is required for the normal intranuclear distribution of pp65 and virion morphogenesis. *J Virol* **79**(24), 15494-502.
- Prichard, M. N., Gao, N., Jairath, S., Mulamba, G., Krosky, P., Coen, D. M., Parker, B. O., and Pari, G. S. (1999). A recombinant human cytomegalovirus with a large deletion in UL97 has a severe replication deficiency. *J Virol* **73**(7), 5663-70.
- Prichard, M. N., Hartline, C. B., Harden, E. A., Daily, S. L., Beadle, J. R., Valiaeva, N., Kern, E. R., and Hostetler, K. Y. (2008). Inhibition of herpesvirus replication by hexadecyloxypropyl esters of purine- and pyrimidine-based phosphonmethoxyethyl nucleoside phosphonates. *Antimicrob Agents Chemother* **52**(12), 4326-30.
- Prichard, M. N., Jairath, S., Penfold, M. E., St Jeor, S., Bohlman, M. C., and Pari, G. S. (1998). Identification of persistent RNA-DNA hybrid structures within the origin of replication of human cytomegalovirus. *J Virol* **72**(9), 6997-7004.
- Prichard, M. N., and Kern, E. R. The search for new therapies for human cytomegalovirus infections. *Virus Res* **157**(2), 212-21.
- Prichard, M. N., Quenelle, D. C., Bidanset, D. J., Komazin, G., Chou, S., Drach, J. C., and Kern, E. R. (2006). Human cytomegalovirus UL27 is not required for viral replication in human tissue implanted in SCID mice. *Virol J* **3**, 18.
- Prichard, M. N., Sztul, E., Daily, S. L., Perry, A. L., Frederick, S. L., Gill, R. B., Hartline, C. B., Streblow, D. N., Varnum, S. M., Smith, R. D., and Kern, E. R. (2008). Human cytomegalovirus UL97 kinase activity is required for the hyperphosphorylation of retinoblastoma protein and inhibits the formation of nuclear aggresomes. *J Virol* **82**(10), 5054-67.

- Qiu, Y. L., Geiser, F., Kira, T., Gullen, E., Cheng, Y. C., Ptak, R. G., Breitenbach, J. M., Drach, J. C., Hartline, C. B., Kern, E. R., and Zemlicka, J. (2000). Synthesis and enantioselectivity of the antiviral effects of (R,Z)-, (S,Z)-methylenecyclopropane analogues of purine nucleosides and phosphoralaninate prodrugs: influence of heterocyclic base, type of virus and host cells. *Antivir Chem Chemother* **11**(3), 191-202.
- Quenelle, D. C., Collins, D. J., and Kern, E. R. (2003). Efficacy of multiple- or single-dose cidofovir against vaccinia and cowpox virus infections in mice. *Antimicrob Agents Chemother* **47**(10), 3275-80.
- Quenelle, D. C., Collins, D. J., Pettway, L. R., Hartline, C. B., Beadle, J. R., Wan, W. B., Hostetler, K. Y., and Kern, E. R. (2008). Effect of oral treatment with (S)-HPMPA, HDP-(S)-HPMPA or ODE-(S)-HPMPA on replication of murine cytomegalovirus (MCMV) or human cytomegalovirus (HCMV) in animal models. *Antiviral Res* **79**(2), 133-5.
- Quenelle, D. C., Collins, D. J., Wan, W. B., Beadle, J. R., Hostetler, K. Y., and Kern, E. R. (2004). Oral treatment of cowpox and vaccinia virus infections in mice with ether lipid esters of cidofovir. *Antimicrob Agents Chemother* **48**(2), 404-12.
- Quenelle, D. C., Lampert, B., Collins, D. J., Rice, T. L., Painter, G. R., and Kern, E. R. Efficacy of CMX001 against herpes simplex virus infections in mice and correlations with drug distribution studies. *J Infect Dis* **202**(10), 1492-9.
- Quenelle, D. C., Prichard, M. N., Keith, K. A., Hruby, D. E., Jordan, R., Painter, G. R., Robertson, A., and Kern, E. R. (2007). Synergistic efficacy of the combination of ST-246 with CMX001 against orthopoxviruses. *Antimicrob Agents Chemother* **51**(11), 4118-24.
- Randhawa, P., Farasati, N. A., Shapiro, R., and Hostetler, K. Y. (2006). Ether lipid ester derivatives of cidofovir inhibit polyomavirus BK replication in vitro. *Antimicrob Agents Chemother* **50**(4), 1564-6.
- Razonable, R. R. (2005). Epidemiology of cytomegalovirus disease in solid organ and hematopoietic stem cell transplant recipients. *Am J Health Syst Pharm* **62**(8 Suppl 1), S7-13.
- Reddehase, M. J. (2000). The immunogenicity of human and murine cytomegaloviruses. *Curr Opin Immunol* **12**(4), 390-6.
- Reefschlaeger, J., Bender, W., Hallenberger, S., Weber, O., Eckenberg, P., Goldmann, S., Haerter, M., Buerger, I., Trappe, J., Herrington, J. A., Haebich, D., and Ruebsamen-Waigmann, H. (2001). Novel non-nucleoside inhibitors of cytomegaloviruses (BAY 38-4766): in vitro and in vivo antiviral activity and mechanism of action. *J Antimicrob Chemother* **48**(6), 757-67.
- Reeves, M. B., Lehner, P. J., Sissons, J. G., and Sinclair, J. H. (2005). An in vitro model for the regulation of human cytomegalovirus latency and reactivation in dendritic cells by chromatin remodelling. *J Gen Virol* **86**(Pt 11), 2949-54.
- Reischig, T., Jindra, P., Hes, O., Svecova, M., Klabocho, J., and Treska, V. (2008). Valacyclovir prophylaxis versus preemptive valganciclovir therapy to prevent cytomegalovirus disease after renal transplantation. *Am J Transplant* **8**(1), 69-77.
- Reitsma, J. M., Savaryn, J. P., Faust, K., Sato, H., Halligan, B. D., and Terhune, S. S. Antiviral inhibition targeting the HCMV kinase pUL97 requires pUL27-dependent degradation of Tip60 acetyltransferase and cell-cycle arrest. *Cell Host Microbe* **9**(2), 103-14.

- Richardson, W. P., Colvin, R. B., Cheeseman, S. H., Tolkoff-Rubin, N. E., Herrin, J. T., Cosimi, A. B., Collins, A. B., Hirsch, M. S., McCluskey, R. T., Russell, P. S., and Rubin, R. H. (1981). Glomerulopathy associated with cytomegalovirus viremia in renal allografts. *N Engl J Med* **305**(2), 57-63.
- Roby, C., and Gibson, W. (1986). Characterization of phosphoproteins and protein kinase activity of virions, noninfectious enveloped particles, and dense bodies of human cytomegalovirus. *J Virol* **59**(3), 714-27.
- Roizman, B. (2000). Redefining virology. *Science* **288**(5475), 2327-8.
- Romaker, D., Schregel, V., Maurer, K., Auerochs, S., Marzi, A., Sticht, H., and Marschall, M. (2006). Analysis of the structure-activity relationship of four herpesviral UL97 subfamily protein kinases reveals partial but not full functional conservation. *J Med Chem* **49**(24), 7044-53.
- Rowshani, A. T., Bemelman, F. J., van Leeuwen, E. M., van Lier, R. A., and ten Berge, I. J. (2005). Clinical and immunologic aspects of cytomegalovirus infection in solid organ transplant recipients. *Transplantation* **79**(4), 381-6.
- Ruiz, J. C., Aldern, K. A., Beadle, J. R., Hartline, C. B., Kern, E. R., and Hostetler, K. Y. (2006). Synthesis and antiviral evaluation of alkoxyalkyl esters of phosphonopropoxymethyl-guanine and phosphonopropoxymethyl-diaminopurine. *Antivir Chem Chemother* **17**(2), 89-95.
- Ruiz, J. C., Beadle, J. R., Aldern, K. A., Keith, K. A., Hartline, C. B., Kern, E. R., and Hostetler, K. Y. (2007). Synthesis and antiviral evaluation of alkoxyalkyl-phosphate conjugates of cidofovir and adefovir. *Antiviral Res* **75**(1), 87-90.
- Rybak, R. J., Hartline, C. B., Qiu, Y. L., Zemlicka, J., Harden, E., Marshall, G., Sommadossi, J. P., and Kern, E. R. (2000). In vitro activities of methylenecyclopropane analogues of nucleosides and their phosphoralaninate prodrugs against cytomegalovirus and other herpesvirus infections. *Antimicrob Agents Chemother* **44**(6), 1506-11.
- Rybak, R. J., Zemlicka, J., Qiu, Y. L., Hartline, C. B., and Kern, E. R. (1999). Effective treatment of murine cytomegalovirus infections with methylenecyclopropane analogues of nucleosides. *Antiviral Res* **43**(3), 175-88.
- Safrin, S., Cherrington, J., and Jaffe, H. S. (1997). Clinical uses of cidofovir. *Rev Med Virol* **7**(3), 145-156.
- Sagedal, S., Nordal, K. P., Hartmann, A., Degre, M., Holter, E., Foss, A., Osnes, K., Leivestad, T., Fauchald, P., and Rollag, H. (2000). A prospective study of the natural course of cytomegalovirus infection and disease in renal allograft recipients. *Transplantation* **70**(8), 1166-74.
- Scheffczik, H., Savva, C. G., Holzenburg, A., Kolesnikova, L., and Bogner, E. (2002). The terminase subunits pUL56 and pUL89 of human cytomegalovirus are DNA-metabolizing proteins with toroidal structure. *Nucleic Acids Res* **30**(7), 1695-703.
- Schleiss, M. (2005). Progress in cytomegalovirus vaccine development. *Herpes* **12**(3), 66-75.
- Schreiber, A., Harter, G., Schubert, A., Bunjes, D., Mertens, T., and Michel, D. (2009). Antiviral treatment of cytomegalovirus infection and resistant strains. *Expert Opin Pharmacother* **10**(2), 191-209.

- Scott, G. M., Weinberg, A., Rawlinson, W. D., and Chou, S. (2007). Multidrug resistance conferred by novel DNA polymerase mutations in human cytomegalovirus isolates. *Antimicrob Agents Chemother* **51**(1), 89-94.
- Selway, J. W. (1986). Antiviral activity of flavones and flavans. *Prog Clin Biol Res* **213**, 521-36.
- Shapira, M. Y., Resnick, I. B., Chou, S., Neumann, A. U., Lurain, N. S., Stamminger, T., Caplan, O., Saleh, N., Efferth, T., Marschall, M., and Wolf, D. G. (2008). Artesunate as a potent antiviral agent in a patient with late drug-resistant cytomegalovirus infection after hematopoietic stem cell transplantation. *Clin Infect Dis* **46**(9), 1455-7.
- Sinclair, J., and Sissons, P. (2006). Latency and reactivation of human cytomegalovirus. *J Gen Virol* **87**(Pt 7), 1763-79.
- Smith, I. L., Cherrington, J. M., Jiles, R. E., Fuller, M. D., Freeman, W. R., and Spector, S. A. (1997). High-level resistance of cytomegalovirus to ganciclovir is associated with alterations in both the UL97 and DNA polymerase genes. *J Infect Dis* **176**(1), 69-77.
- Snoeck, R., Wellens, W., Desloovere, C., Van Ranst, M., Naesens, L., De Clercq, E., and Feenstra, L. (1998). Treatment of severe laryngeal papillomatosis with intralesional injections of cidofovir [(S)-1-(3-hydroxy-2-phosphonylmethoxypropyl)cytosine]. *J Med Virol* **54**(3), 219-25.
- Soderberg-Naucler, C. (2006). Does cytomegalovirus play a causative role in the development of various inflammatory diseases and cancer? *J Intern Med* **259**(3), 219-46.
- Soderberg-Naucler, C., Fish, K. N., and Nelson, J. A. (1997). Reactivation of latent human cytomegalovirus by allogeneic stimulation of blood cells from healthy donors. *Cell* **91**(1), 119-26.
- Soderberg-Naucler, C., and Nelson, J. Y. (1999). Human cytomegalovirus latency and reactivation - a delicate balance between the virus and its host's immune system. *Intervirology* **42**(5-6), 314-21.
- Sokos, D. R., Berger, M., and Lazarus, H. M. (2002). Intravenous immunoglobulin: appropriate indications and uses in hematopoietic stem cell transplantation. *Biol Blood Marrow Transplant* **8**(3), 117-30.
- Speich, R., and van der Bij, W. (2001). Epidemiology and management of infections after lung transplantation. *Clin Infect Dis* **33 Suppl 1**, S58-65.
- Springer, K. L., Chou, S., Li, S., Giller, R. H., Quinones, R., Shira, J. E., and Weinberg, A. (2005). How evolution of mutations conferring drug resistance affects viral dynamics and clinical outcomes of cytomegalovirus-infected hematopoietic cell transplant recipients. *J Clin Microbiol* **43**(1), 208-13.
- Stals, F. S., de Clercq, E., and Bruggeman, C. A. (1991). Comparative activity of (S)-1-(3-hydroxy-2-phosphonylmethoxypropyl)cytosine and 9-(1,3-dihydroxy-2-propoxymethyl)guanine against rat cytomegalovirus infection in vitro and in vivo. *Antimicrob Agents Chemother* **35**(11), 2262-6.
- Sudarsanam, T. D., Sahni, R. D., and John, G. T. (2006). Leflunomide: a possible alternative for ganciclovir sensitive and resistant cytomegalovirus infections. *Postgrad Med J* **82**(967), 313-4.

- Sullivan, V., Biron, K. K., Talarico, C., Stanat, S. C., Davis, M., Pozzi, L. M., and Coen, D. M. (1993). A point mutation in the human cytomegalovirus DNA polymerase gene confers resistance to ganciclovir and phosphonylmethoxyalkyl derivatives. *Antimicrob Agents Chemother* **37**(1), 19-25.
- Sullivan, V., Talarico, C. L., Stanat, S. C., Davis, M., Coen, D. M., and Biron, K. K. (1992). A protein kinase homologue controls phosphorylation of ganciclovir in human cytomegalovirus-infected cells. *Nature* **358**(6382), 162-4.
- Sun, H. Y., Wagener, M. M., and Singh, N. (2008). Prevention of posttransplant cytomegalovirus disease and related outcomes with valganciclovir: a systematic review. *Am J Transplant* **8**(10), 2111-8.
- Talarico, C. L., Burnette, T. C., Miller, W. H., Smith, S. L., Davis, M. G., Stanat, S. C., Ng, T. I., He, Z., Coen, D. M., Roizman, B., and Biron, K. K. (1999). Acyclovir is phosphorylated by the human cytomegalovirus UL97 protein. *Antimicrob Agents Chemother* **43**(8), 1941-6.
- Tanguay, R. L., and Gallie, D. R. (1996). Translational efficiency is regulated by the length of the 3' untranslated region. *Mol Cell Biol* **16**(1), 146-56.
- Teo, I. A., Griffin, B. E., and Jones, M. D. (1991). Characterization of the DNA polymerase gene of human herpesvirus 6. *J Virol* **65**(9), 4670-80.
- Thomas, M., Rechter, S., Milbradt, J., Auerochs, S., Muller, R., Stamminger, T., and Marschall, M. (2009). Cytomegaloviral protein kinase pUL97 interacts with the nuclear mRNA export factor pUL69 to modulate its intranuclear localization and activity. *J Gen Virol* **90**(Pt 3), 567-78.
- Torres-Madriz, G., and Boucher, H. W. (2008). Immunocompromised hosts: perspectives in the treatment and prophylaxis of cytomegalovirus disease in solid-organ transplant recipients. *Clin Infect Dis* **47**(5), 702-11.
- Toth, K., Spencer, J. F., Dhar, D., Sagartz, J. E., Buller, R. M., Painter, G. R., and Wold, W. S. (2008). Hexadecyloxypropyl-cidofovir, CMX001, prevents adenovirus-induced mortality in a permissive, immunosuppressed animal model. *Proc Natl Acad Sci U S A* **105**(20), 7293-7.
- Townsend, L. B., Devivar, R. V., Turk, S. R., Nassiri, M. R., and Drach, J. C. (1995). Design, synthesis, and antiviral activity of certain 2,5,6-trihalo-1-(beta-D-ribofuranosyl)benzimidazoles. *J Med Chem* **38**(20), 4098-105.
- Underwood, M. R., Harvey, R. J., Stanat, S. C., Hemphill, M. L., Miller, T., Drach, J. C., Townsend, L. B., and Biron, K. K. (1998). Inhibition of human cytomegalovirus DNA maturation by a benzimidazole ribonucleoside is mediated through the UL89 gene product. *J Virol* **72**(1), 717-25.
- Valiaeva, N., Beadle, J. R., Aldern, K. A., Trahan, J., and Hostetler, K. Y. (2006). Synthesis and antiviral evaluation of alkoxyalkyl esters of acyclic purine and pyrimidine nucleoside phosphonates against HIV-1 in vitro. *Antiviral Res* **72**(1), 10-9.
- Varnum, S. M., Streblow, D. N., Monroe, M. E., Smith, P., Auberry, K. J., Pasa-Tolic, L., Wang, D., Camp, D. G., 2nd, Rodland, K., Wiley, S., Britt, W., Shenk, T., Smith, R. D., and Nelson, J. A. (2004). Identification of proteins in human cytomegalovirus (HCMV) particles: the HCMV proteome. *J Virol* **78**(20), 10960-6.

- Vigano, M., Dengler, T., Mattei, M. F., Poncelet, A., Vanhaecke, J., Vermes, E., Kleinloog, R., Li, Y., Gezahegen, Y., and Delgado, J. F. Lower incidence of cytomegalovirus infection with everolimus versus mycophenolate mofetil in de novo cardiac transplant recipients: a randomized, multicenter study. *Transpl Infect Dis* **12**(1), 23-30.
- Wagstaff, A. J., and Bryson, H. M. (1994). Foscarnet. A reappraisal of its antiviral activity, pharmacokinetic properties and therapeutic use in immunocompromised patients with viral infections. *Drugs* **48**(2), 199-226.
- Waldman, W. J., Knight, D. A., Lurain, N. S., Miller, D. M., Sedmak, D. D., Williams, J. W., and Chong, A. S. (1999). Novel mechanism of inhibition of cytomegalovirus by the experimental immunosuppressive agent leflunomide. *Transplantation* **68**(6), 814-25.
- Walter, E. A., Greenberg, P. D., Gilbert, M. J., Finch, R. J., Watanabe, K. S., Thomas, E. D., and Riddell, S. R. (1995). 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* **333**(16), 1038-44.
- Wan, W. B., Beadle, J. R., Hartline, C., Kern, E. R., Ciesla, S. L., Valiaeva, N., and Hostetler, K. Y. (2005). Comparison of the antiviral activities of alkoxyalkyl and alkyl esters of cidofovir against human and murine cytomegalovirus replication in vitro. *Antimicrob Agents Chemother* **49**(2), 656-62.
- Wang, X., Huong, S. M., Chiu, M. L., Raab-Traub, N., and Huang, E. S. (2003). Epidermal growth factor receptor is a cellular receptor for human cytomegalovirus. *Nature* **424**(6947), 456-61.
- Wathen, M. W. (2002). Non-nucleoside inhibitors of herpesviruses. *Rev Med Virol* **12**(3), 167-78.
- Weinberg, A., Jabs, D. A., Chou, S., Martin, B. K., Lurain, N. S., Forman, M. S., and Crumpacker, C. (2003). Mutations conferring foscarnet resistance in a cohort of patients with acquired immunodeficiency syndrome and cytomegalovirus retinitis. *J Infect Dis* **187**(5), 777-84.
- Williams, J. W., Mital, D., Chong, A., Kottayil, A., Millis, M., Longstreth, J., Huang, W., Brady, L., and Jensik, S. (2002). Experiences with leflunomide in solid organ transplantation. *Transplantation* **73**(3), 358-66.
- Williams, S. L., Hartline, C. B., Kushner, N. L., Harden, E. A., Bidanset, D. J., Drach, J. C., Townsend, L. B., Underwood, M. R., Biron, K. K., and Kern, E. R. (2003). In vitro activities of benzimidazole D- and L-ribonucleosides against herpesviruses. *Antimicrob Agents Chemother* **47**(7), 2186-92.
- Williams-Aziz, S. L., Hartline, C. B., Harden, E. A., Daily, S. L., Prichard, M. N., Kushner, N. L., Beadle, J. R., Wan, W. B., Hostetler, K. Y., and Kern, E. R. (2005). Comparative activities of lipid esters of cidofovir and cyclic cidofovir against replication of herpesviruses in vitro. *Antimicrob Agents Chemother* **49**(9), 3724-33.
- Winston, D. J., Young, J. A., Pullarkat, V., Papanicolaou, G. A., Vij, R., Vance, E., Alangaden, G. J., Chemaly, R. F., Petersen, F., Chao, N., Klein, J., Sprague, K., Villano, S. A., and Boeckh, M. (2008). Maribavir prophylaxis for prevention of cytomegalovirus infection in allogeneic stem cell transplant recipients: a multicenter, randomized, double-blind, placebo-controlled, dose-ranging study. *Blood* **111**(11), 5403-10.

- Wohl, D. A., Kendall, M. A., Owens, S., Holland, G., Nokta, M., Spector, S. A., Schrier, R., Fiscus, S., Davis, M., Jacobson, M. A., Currier, J. S., Squires, K., Alston-Smith, B., Andersen, J., Freeman, W. R., Higgins, M., and Torriani, F. J. (2005). The safety of discontinuation of maintenance therapy for cytomegalovirus (CMV) retinitis and incidence of immune recovery uveitis following potent antiretroviral therapy. *HIV Clin Trials* **6**(3), 136-46.
- Wolf, D. G., Courcelle, C. T., Prichard, M. N., and Mocarski, E. S. (2001). Distinct and separate roles for herpesvirus-conserved UL97 kinase in cytomegalovirus DNA synthesis and encapsidation. *Proc Natl Acad Sci U S A* **98**(4), 1895-900.
- Wolf, D. G., Smith, I. L., Lee, D. J., Freeman, W. R., Flores-Aguilar, M., and Spector, S. A. (1995). Mutations in human cytomegalovirus UL97 gene confer clinical resistance to ganciclovir and can be detected directly in patient plasma. *J Clin Invest* **95**(1), 257-63.
- Woon, H. G., Scott, G. M., Yiu, K. L., Miles, D. H., and Rawlinson, W. D. (2008). Identification of putative functional motifs in viral proteins essential for human cytomegalovirus DNA replication. *Virus Genes* **37**(2), 193-202.
- Wright, M. E., Suzman, D. L., Csaky, K. G., Masur, H., Polis, M. A., and Robinson, M. R. (2003). Extensive retinal neovascularization as a late finding in human immunodeficiency virus-infected patients with immune recovery uveitis. *Clin Infect Dis* **36**(8), 1063-6.
- Wu, Z., Drach, J. C., Prichard, M. N., Yanachkova, M., Yanachkov, I., Bowlin, T. L., and Zemlicka, J. (2009). L-valine ester of cyclopropavir: a new antiviral prodrug. *Antivir Chem Chemother* **20**(1), 37-46.
- Zemlicka, J. (1993). Nucleosides and nucleotides as antitumor and antiviral agents. In: C.K. Chu and D.C. Baker, Editors. *Allenols Derived from Nucleic Acids Bases—A New Class of Anti-HIV Agents: Chemistry and Biological Activity*, x, Plenum Press, New York . 336 pp..
- Zhang, J., Chung, D. W., Tan, C. K., Downey, K. M., Davie, E. W., and So, A. G. (1991). Primary structure of the catalytic subunit of calf thymus DNA polymerase delta: sequence similarities with other DNA polymerases. *Biochemistry* **30**(51), 11742-50.
- Zhou, S., Breitenbach, J. M., Borysko, K. Z., Drach, J. C., Kern, E. R., Gullen, E., Cheng, Y. C., and Zemlicka, J. (2004). Synthesis and antiviral activity of (Z)- and (E)-2,2-[bis(hydroxymethyl)cyclopropylidene]methylpurines and -pyrimidines: second-generation methylenecyclopropane analogues of nucleosides. *J Med Chem* **47**(3), 566-75.
- Zhou, S., Kern, E. R., Gullen, E., Cheng, Y. C., Drach, J. C., Matsumi, S., Mitsuya, H., and Zemlicka, J. (2004). (Z)- and (E)-[2-Fluoro-2-(hydroxymethyl)cyclopropylidene]methylpurines and -pyrimidines, a new class of methylenecyclopropane analogues of nucleosides: synthesis and antiviral activity. *J Med Chem* **47**(27), 6964-72.
- Zhou, S., and Zemlicka, J. (2007). Synthesis of 2,2,3-tris(hydroxymethyl)methylenecyclopropane analogues of nucleosides. *Nucleosides Nucleotides Nucleic Acids* **26**(4), 391-402.
- Zhou, S., Zemlicka, J., Kern, E. R., and Drach, J. C. (2007). Fluoroanalogues of anti-cytomegalovirus agent cyclopropavir: synthesis and antiviral activity of (E)- and (Z)-9-{{2,2-bis(hydroxymethyl)-3-fluorocyclopropylidene}methyl}-adenines and guanines. *Nucleosides Nucleotides Nucleic Acids* **26**(3), 231-43.
- Zimmermann, A., Wilts, H., Lenhardt, M., Hahn, M., and Mertens, T. (2000). Indolocarbazoles exhibit strong antiviral activity against human cytomegalovirus and are potent inhibitors of the pUL97 protein kinase. *Antiviral Res* **48**(1), 49-60.



Zydek, M., Hagemeyer, C., and Wiebusch, L. Cyclin-dependent kinase activity controls the onset of the HCMV lytic cycle. *PLoS Pathog* **6**(9).

# **Travaux annexes**

## **Publication 5**

Méthode de génotypage direct des protéines d'enveloppe du  
cytomégalovirus humain à partir d'échantillons de salive prélevés sur des  
enfants en crèche

*Direct genotyping of cytomegalovirus envelope glycoproteins from  
toddler's saliva samples*

*J Clin Virol, 2009*

**Publication 6**

Résistance du cytomégalovirus aux antiviraux

*Virologie, 2009*



Le CMVH est unherpesvirus ubiquitaire, qui infecte environ un individu sur deux, et persiste sous forme latente après la primo-infection. La gravité des infections à CMVH au cours du sida, après transplantation d'organe ou de cellules souches hématopoïétiques, et au cours de toute pathologie nécessitant ou entraînant une immunodépression cellulaire importante justifie l'utilisation de traitements antiviraux, curatifs et préventifs. Les antiviraux actuellement disponibles en pratique clinique sont peu nombreux, présentent une toxicité qui limite leur utilisation et a conduit à l'émergence de mutations conférant des résistances à ces molécules. Les acteurs principaux de ces résistances sont les gènes *UL54* et *UL97* qui codent respectivement l'ADN polymérase virale et une kinase nécessaire à l'activation de la molécule thérapeutique la plus utilisée : le ganciclovir.

Au cours de notre travail, nous avons étudié l'émergence des mutations de résistance au sein d'une cohorte multicentrique de patients transplantés et avons pu mettre en évidence de nouvelles mutations. Nous avons aussi développé une technique basée sur la technologie des BAC qui nous a permis de caractériser l'impact de deux nouvelles mutations dans *UL54*.

Dans une même optique, nous avons développé un test d'activité kinase *in vitro* non radioactif afin de déterminer l'impact des mutations sur l'activité d'*UL97* et une étude structurale nous a amené à l'hypothèse qu'*UL27* serait un potentiel cofacteur de cette kinase et aurait un rôle dans la résistance.

Enfin, nous avons pu mettre en évidence au moins trois flavonoïdes, des molécules issues du monde végétal, inhibant activement la réplication du CMVH *in vitro*.

Mots clés : cytomegalovirus-antiviraux-résistance-flavonoïdes-*UL54*-*UL97*

### **Human cytomegalovirus, resistance mutations, and new antiviral drugs**

HCMV is a ubiquitous herpesvirus which infects about fifty percent of the population and persists at latent state after primo infection. Severity of HCMV infections during AIDS, after organ or hematopoietic stem cells transplant and during pathologies that require or lead to cell immunosuppression justify the use of antiviral, curative and preventative treatments. The few antiviral drugs currently available in clinical practice reveal a toxicity that limits their use and lead to an emergence of conferring mutations that offers resistance to these molecules. The key players of this resistance are *UL54* and *UL97* genes that encode respectively viral DNA polymerase and a kinase necessary to the activation of the most used therapeutic molecule which is the ganciclovir.

During our work, we have studied the emergence of resistance mutations within multicenter cohort of transplant recipients and we could have highlighted new resistance mutations.

We have also developed a technique based on the BAC technology which allowed us to characterize the impact of two new mutations in *UL54*.

Within the similar objectives, we developed *in vitro* nonradioactive kinase activity test in order to determine the mutations impact on *UL97* activity and a structural study lead us to the hypothesis that *UL27* might be a potential cofactor of this kinase and might have a role in the resistance.

Finally, we have highlighted at least three flavonoids, molecules from plant world, inhibiting actively *in vitro* HCMV replication.

Key words : cytomegalovirus-antivirals-resistance-flavonoids-*UL54*-*UL97*