



Étude des mécanismes biochimiques et moléculaires de la résistance du cytomégalo virus humain et du virus herpès simplex 1 au foscarnet.

Thèse

Karima Zarrouk

Doctorat en microbiologie-immunologie
Philosophiæ doctor (Ph. D.)

Québec, Canada



Étude des mécanismes biochimiques et moléculaires
de la résistance du cytomegalovirus humain et du virus
herpès simplex 1 au foscarnet.

Thèse

Karima Zarrouk

Doctorat en microbiologie-immunologie

Philosophiae doctor (PhD)

Québec, Canada

Sous la direction du Dr. Guy Boivin,
directeur de recherche

© Karima Zarrouk, 2021

Résumé

La structure des ADN polymérase (pol) du cytomegalovirus humain (CMV) et du virus herpès simplex 1 (VHS-1), appartenant tous deux à la famille des *Herpesviridae*, est associée à la forme d'une main droite comportant entre autres les domaines de la paume, du pouce et des doigts. L'ADN pol adopte différentes conformations (ouverte et fermée) impliquant un mouvement du domaine des doigts dans le but de faciliter l'interaction entre le nucléotide et l'ADN en cours d'élongation. Il a été montré que l'antiviral foscarnet (FOS) qui cible l'ADN pol du CMV et du VHS-1 se lierait à l'enzyme quand elle est dans sa conformation fermée et que des mutations dans le domaine des doigts conférant la résistance à cet antiviral favoriseraient une conformation plus ouverte de l'enzyme pour laquelle le FOS a une affinité plus faible. Nous avons voulu analyser si cette hypothèse s'appliquait également à des mutations qui sont localisées dans des régions du domaine NH₂-terminal et de la paume qui interagissent avec le domaine des doigts lors des changements de conformation de l'enzyme au cours de la réaction de polymérisation.

Notre hypothèse est que des mutations localisées dans l'hélice K (domaine NH₂-terminal) et la région II (domaine de la paume) qui participent aux changements de conformation de l'enzyme pourraient favoriser une conformation plus ouverte des ADN pol virales, et par conséquent, réduire la sensibilité des virus au FOS. Nous avons donc sélectionné des substitutions théoriques en utilisant une stratégie basée sur l'alignement des séquences en acides aminés des ADN pol du CMV et du VHS-1 (sensibles au FOS) avec celles des bactériophages RB69 et T4 (résistantes au FOS).

Nous avons tenté de générer les virus recombinants CMV et VHS-1 possédant les différentes substitutions théoriques sélectionnées. Cependant, l'introduction de certaines substitutions [Q578P, R581T, L587F (hélice K), P712Y, F718L (région II) pour le CMV et Q617P, R620T, L626F (hélice K), F718L (région II) pour le VHS-1] étaient délétères pour les ADN pol, ce qui empêchait les virus recombinants de se répliquer en culture cellulaire. Parmi les substitutions sélectionnées dans l'hélice K, la substitution I619K confère une résistance du VHS-1 au FOS. Au sein de l'hélice K, nous avons également caractérisé la substitution théorique Q579I qui conférerait une hypersensibilité du CMV au FOS. Nous avons caractérisé cette substitution en la comparant à la mutation K805Q localisée dans l'hélice P (domaine des doigts) déjà connue pour induire une hypersensibilité du CMV au FOS. Dans la région II, les substitutions V715S et A719T confèrent une résistance des deux virus au FOS. La substitution Q697P du CMV confère une résistance du CMV au FOS mais pas pour le VHS-1. Les profils de sensibilité des virus recombinants au FOS ont également été confirmés par des tests enzymatiques dans lesquels nous avons déterminé l'inhibition de l'activité des ADN pol

recombinantes mutées par cet antiviral. Nous avons également constaté une diminution des capacités répliquatives des CMV et VHS-1 recombinants possédant ces substitutions par rapport à celle des virus sauvages correspondants. Des analyses tri-dimensionnelles ont été réalisées et ont suggéré que les substitutions conférant une résistance au FOS seraient associées à une déstabilisation de la conformation fermée des ADN pol et favoriseraient une conformation plus ouverte pour laquelle l'antiviral a une plus faible affinité. D'autre part, les modélisations tri-dimensionnelles des protéines possédant les substitutions conférant une hypersensibilité au FOS ont montré que les ADN pol favorisaient une conformation plus fermée pour laquelle le FOS a une plus grande affinité. La caractérisation de la substitution théorique V715S du CMV et du VHS-1 (FOS^R/GCV^R et FOS^R/ACV^R, respectivement) a été comparée aux substitutions V715G du VHS-1 (FOS^R/ACV^R), V715M du CMV et du VHS-1 (FOS^R/GCV^S et FOS^S/ACV^R, respectivement), déjà décrites dans la littérature. Brièvement, nous avons montré que l'introduction de ces différentes substitutions induisaient des changements au niveau de l'environnement hydrophobe de la valine à la position 715 influençant ainsi les phénotypes de sensibilité aux antiviraux observés. L'ensemble de ces résultats nous ont permis d'appuyer notre hypothèse selon laquelle les mutations localisées dans l'hélice K et la région II peuvent influencer la sensibilité des virus au FOS en modifiant la structure de la protéine et en interférant avec les changements de conformation de l'enzyme.

Abstract

The structure of the human cytomegalovirus (HCMV) and herpes simplex virus 1 (HSV-1) DNA polymerase (pol), belonging to the *Herpesviridae* family, is associated to a right hand with palm, thumb and fingers domains. The viral DNA pol adopts different conformations (open and closed) that implies a move of the fingers domain to facilitate the interaction between the nucleotide and the elongating DNA. It has been shown that the antiviral foscarnet (FOS) which targets the HCMV and HSV-1 DNA pol binds to the enzyme in its closed conformation and mutations conferring resistance to this antiviral and localised in the fingers domain would favor a more open conformation of the enzyme for which FOS has a lower affinity. The aim of this thesis was to analyse whether this hypothesis could be extended to mutations localised in the NH₂-terminal and the palm domains which interact with the fingers domain during the conformational changes of the enzyme during the polymerization process.

Our hypothesis is that mutations localized in the helix K (NH₂-terminal domain) and region II (palm domain) that participate in the conformational changes of the enzyme could favor a more open conformation of the viral DNA pol, and thus, decrease the susceptibility of viruses to FOS. We selected theoretical substitutions using a strategy based on amino acid sequences alignment of the DNA pol of HCMV and HSV-1 (susceptible to FOS) with those of RB69 and T4 bacteriophages (naturally resistant to this antiviral).

We tried to generate recombinant HCMV and HSV-1 containing the different theoretical substitutions that we selected. However, the introduction of some theoretical substitutions [Q578P, R581T, L587F (helix K), P712Y, F718L (region II) for HCMV and Q617P, R620T, L626F (helix K), F718L (region II) for HSV-1] was so detrimental for the DNA pol that recombinant viruses were not able to grow in cell culture. Among the substitutions selected in the helix K, the substitution I619K confers resistance of HSV-1 to FOS. In the helix K, we also characterized the theoretical Q579I substitution that confers hypersusceptibility of HCMV to FOS. We compared this substitution with the K805Q substitution located in the helix P (fingers domain), already known to induce hypersusceptibility of HCMV to FOS. In region II, substitutions V715S and A719T confer resistance of both viruses to FOS whereas the Q697P substitution was associated with resistance of HCMV to FOS but not for HSV-1. The susceptibility profiles of recombinant viruses to FOS were confirmed by enzymatic assays that allowed us to determine the inhibition of the recombinant mutated DNA pol activity by this antiviral compound. We observed a decrease of the replicative capacities of recombinant HCMV and HSV-1 harboring these mutations compared to their wild-type counterparts.

Tri-dimensional modeling was also performed to better understand the impact of these substitutions on the DNA pol of HCMV and HSV-1. On the one hand, substitutions conferring resistance to FOS were associated to a destabilization of the closed conformation of the DNA pol and would favor a more open conformation for which the antiviral has a lower affinity. On the other hand, substitutions associated to a hypersusceptibility profile would favor a more closed conformation of the DNA pol for which FOS has a higher affinity. The characterization of the theoretical substitution V715S of HCMV and HSV-1 (FOS^R/GCV^R and FOS^R/ACV^R, respectively) was compared to the substitutions V715G of HSV-1 (FOS^R/ACV^R), V715M of HCMV and HSV-1 (FOS^R/GCV^S and FOS^S/ACV^R, respectively), already described in the literature and that were, thus, associated with different antiviral susceptibility phenotypes compared to those of V715S. Briefly, we showed that the introduction of these different substitutions could induce varying changes of the hydrophobic environment of the valine at position 715 influencing the antiviral susceptibility profile. Altogether, these results support our hypothesis that substitutions in helix K and region II could influence the susceptibility of HCMV and HSV-1 to FOS by modifying the protein structure and impacting the correct conformational changes of the enzyme.

Table des matières

Résumé	ii
Abstract	iv
Table des matières	vi
Liste des figures	x
Liste des tableaux	xi
Liste des abréviations, sigles, acronymes.....	xii
Remerciements	xv
Avant-propos	xvii
INTRODUCTION.....	1
Partie I : Les <i>Herpesviridae</i>	1
I- Généralités sur les virus herpétiques humains.....	2
II- Le cytomégalovirus humain et le virus herpès simplex 1	4
A- Structure morphologique.....	4
1) Capside du CMV et VHS-1	4
2) Particularités de l'enveloppe et du tégument du CMV	5
3) Particularités de l'enveloppe et du tégument du VHS-1	6
B- Organisation génomique	7
C- Un cycle réplicatif commun au sein des virus herpétiques	8
1) Entrée du CMV et du VHS-1 dans la cellule hôte	8
2) Transcription séquentielle des gènes viraux.....	10
3) Réplication du génome viral	11
4) Encapsidation, maturation et bourgeonnement	14
D- La latence, une caractéristique des virus herpétiques.....	15
1) Latence du CMV	15
2) Latence du VHS-1	15
III- Les ADN polymérases, enzymes indispensables à la réplication	16
A- Généralités sur les ADN pol de la famille B.....	16
B- UL54 et UL30, ADN pol du CMV et du VHS-1	17
C- Activités des ADN pol du CMV et du VHS-1	18
Partie II : Manifestations cliniques, diagnostic et immunologie.....	19
I- Manifestations cliniques associées au cytomégalovirus humain.....	19
A- Infections chez les personnes immunocompétentes.....	19
B- Infections chez les personnes immunosupprimées.....	19
C- Infections congénitales	20
D- Diagnostics des infections à CMV	21

II- Manifestations cliniques associées au VHS-1	21
A- Infections oro-labiales	22
B- Infections oculaires	22
C- Infections génitales.....	22
D- Infections néonatales induites par le VHS-1	22
E- Encéphalites herpétiques	23
F- Infections chez les personnes immunosupprimées.....	23
G- Diagnostics des infections causées par le VHS-1	24
III-Réponse immunitaire induite par le CMV et le VHS-1	25
A- L'immunité innée en réponse aux infections par CMV et VHS-1	25
B- Les réactivations et le système immunitaire adaptatif.....	27
C- L'évasion immunitaire du CMV et du VHS-1	28
Partie III : Vaccins, traitements et résistance	31
I-Vaccins	31
A- Développement d'un vaccin contre le CMV, une priorité	31
1) Vaccins vivants atténués	31
2) Vaccins sous-unitaires.....	31
3) Vaccins à ADN/ARN, particules pseudo-virales et vecteurs viraux.....	32
B- Vaccins protégeant contre le VHS-1	33
II- Antiviraux.....	34
A- Analogues de nucléosides	34
1) Le ganciclovir et sa pro-drogue le valganciclovir.....	34
2) L'acyclovir, le penciclovir et leur pro-drogue.....	35
B- Analogue de nucléotides	36
C- Analogue du pyrophosphate.....	37
D- Inhibiteurs du complexe terminase du CMV	38
E- Antiviraux en développement clinique	39
1) Maribavir.....	39
2) Cyclopropavir.....	39
3) Brincidofovir	40
4) Inhibiteurs du complexe hélicase-primase	40
F- Traitements non-conventionnels	40
1) Cas du CMV.....	41
2) Cas du VHS-1.....	41
III- Résistance aux antiviraux	42
A- Résistance aux antiviraux dans le cas d'infections au CMV.....	42
1) Mutations dans le gène <i>UL97</i> du CMV.....	42

2)	Mutations dans le gène <i>UL54</i> du CMV	44
3)	Mutations associées à une résistance du CMV au LTV	47
B-	Résistance aux antiviraux dans le cas d'infections au VHS-1	48
1)	Mutations dans le gène <i>UL23</i>	48
2)	Mutations localisées dans le gène <i>UL30</i>	51
C-	Répartition des mutations de résistance aux antiviraux associées aux ADN pol chez les virus herpétiques	52
D-	Diagnostic de la résistance aux antiviraux et prise en charge des patients	53
1)	Tests phénotypes et génotypiques	53
2)	Prise en charge des patients infectés par le CMV	54
3)	Prise en charge des patients infectés par le VHS-1	54
E-	Caractérisation des mutations conférant une résistance aux antiviraux	55
1)	Virus recombinants	55
2)	Activités des ADN pol et inhibition par le FOS.....	58
3)	Modèle d'études des ADN pol et modélisations	58
Chapitre 1 : Hypothèse & Objectifs de la thèse		64
1.1	Hypothèse.....	64
1.2	Objectifs	64
1)	Étude des mécanismes de résistance du CMV et du VHS-1 au FOS.....	64
2)	Étude des mécanismes d'hypersensibilité du CMV au FOS.....	65
3)	Effet différentiel de substitutions au codon 715 des ADN pol du CMV et du VHS-1 ..66	
Chapitre 2 : Résistance du cytomégalovirus humain et du virus herpès simplex 1 au foscarnet induite par des mutations dans l'hélice K et la région II des ADN polymérase virales		67
2.1	Résumé	67
2.2	Abstract	67
2.3	Article.....	68
ABSTRACT	69
Introduction	71
Results	72
Discussion	78
Materials and Methods	80
Chapitre 3 : Hypersensibilité du cytomégalovirus humain au foscarnet induite par des mutations dans les hélices K et P de l'ADN polymérase virale		98
3.1	Résumé	98
3.2	Abstract	98
3.3	Article.....	99
Chapitre 4 : Effets différentiels de substitutions au codon 715 de la région II du domaine de la paume des ADN polymérase du VHS-1 et du CMV.....		112

4.1 Résumé	112
4.2 Abstract	112
4.3 Article.....	113
Chapitre 5 : Discussion	129
Conclusion.....	146
Bibliographie	147
Annexe A : Article supplémentaire	159

Liste des figures

Figure 1 : Arbre phylogénétique des <i>Herpesviridae</i> représentant 40 virus de cette famille.	1
Figure 2 : Représentation des capsides du CMV (A) et du VHS-1 (B).	5
Figure 3 : Organisation génomique du VHS-1 et du CMV.	7
Figure 4 : Entrée du CMV dans la cellule hôte.	9
Figure 5 : Entrée du VHS-1 dans la cellule hôte.	10
Figure 6 : Représentation du cycle viral du CMV et du VHS-1.	11
Figure 7 : Réplication du CMV et du VHS-1.	13
Figure 8 : Représentation de l'établissement de la latence du VHS-1 dans les ganglions sensitifs et réactivation.	16
Figure 9 : Arbre phylogénétique des ADN pol B.	17
Figure 10 : Voies d'activation induites par les TLR.	26
Figure 11 : Représentation de la structure de la guanosine et des analogues de la déoxyguanosine, soit le ganciclovir et le valganciclovir.	34
Figure 12 : Mécanismes d'action des différentes classes d'agents antiviraux.	35
Figure 13 : Représentation de la structure de la guanosine, de l'ACV, du PCV et de leur pro-drogue respective.	36
Figure 14 : Représentation de la structure de la cytidine et du cidofovir.	37
Figure 15 : Représentation de la structure du pyrophosphate et du foscarnet.	38
Figure 16 : Représentation de la structure du letermovir.	38
Figure 17 : Distribution des mutations localisées dans le gène <i>UL97</i> et associées à une résistance au ganciclovir ou au polymorphisme.	43
Figure 18 : Distribution des mutations conférant la résistance aux antiviraux localisées dans le gène <i>UL54</i> du CMV.	45
Figure 19 : Distribution des mutations conférant une résistance au letermovir dans les gènes <i>UL56</i> , <i>UL89</i> et <i>UL51</i> du CMV.	48
Figure 20 : Distribution des mutations conférant une résistance à l'acyclovir et localisées dans le gène <i>UL23</i> du VHS-1 et du VHS-2.	49
Figure 21 : Distribution des mutations cliniques conférant la résistance aux antiviraux localisées dans le gène <i>UL30</i> du VHS-1 et du VHS-2.	51
Figure 22 : Schéma représentant les étapes permettant d'introduire une mutation dans un gène du CMV par mutagénèse en passant.	56
Figure 23 : Schéma représentant le système de cosmides et plasmides utilisé pour reconstituer le génome du VHS-1.	57
Figure 24 : Représentation de l'ADN pol gp43 du bactériophage RB69 en mode réplication.	59
Figure 25 : Représentation du mécanisme de polymérisation des ADN polymérases du CMV et du VHS-1.	60
Figure 26 : Modélisation 3D de l'ADN pol <i>UL54</i> dans sa conformation ouverte et fermée.	62
Figure 27 : Structure de l'ADN pol <i>UL30</i> du VHS-1 dans sa conformation ouverte.	63
Figure 28 : Alignements de séquences de l'hélice K du domaine NH ₂ -terminal (A) et de la région II de la paume (B) des ADN pol des bactériophages T4 et RB69, du CMV et du VHS-1.	65
Figure 30 : Localisation sur l'ADN pol <i>UL30</i> des acides aminés dont les mutations confèrent une résistance du VHS-1 au FOS.	132
Figure 31 : Localisation sur l'ADN pol du VHS-1 des acides aminés de l'hélice K dont les substitutions sont associées à un défaut de croissance en culture cellulaire.	138

Liste des tableaux

Tableau 1 : Classification des virus herpétiques humains et principales manifestations cliniques associées, leurs cellules cibles et leurs sites de latence.	3
Tableau 2 : Principaux mécanismes d'évasion du CMV au système immunitaire.	29
Tableau 3 : Principaux mécanismes d'évasion du VHS-1 au système immunitaire.	30
Tableau 4 : Liste des mutations localisées dans le gène <i>UL97</i> et associées à une résistance du CMV au GCV.	44
Tableau 5 : Liste des mutations cliniques localisées dans le gène <i>UL54</i> et associées à une résistance du CMV aux antiviraux.	46
Tableau 6 : Liste des mutations localisées dans le gène <i>UL23</i> et associées à une résistance du VHS-1 (A) et du VHS-2 (B) à l'ACV.	50
Tableau 7 : Liste des mutations localisées dans le gène <i>UL30</i> et associées à une résistance du VHS-1 (A) et du VHS-2 (B) aux antiviraux.	52
Tableau 8 : Substitutions dans les gènes <i>UL54</i> (CMV) (A) et <i>UL30</i> (VHS-1) (B) associées à un défaut de croissance en culture cellulaire.	136

Liste des abréviations, sigles, acronymes

ACV	: acyclovir
ADN	: acide désoxyribonucléique
ADNdb	: acide désoxyribonucléique double brin
ADN pol	: ADN polymérase
ARN	: acide ribonucléique
ARNm	: ARN messenger
ART	: artésunate
ATP	: adénosine triphosphate
BAC	: de l'anglais « <i>Bacterial artificial chromosome</i> »
BCV	: brincidofovir
CCMV	: infections congénitales à CMV
CD	: cellule dendritique
CDV	: cidofovir
CDV ^R	: résistant au cidofovir
CDV ^S	: sensible au cidofovir
cGAMP	: de l'anglais « <i>cyclic guanosine monophosphate - adenosine monophosphate</i> »
cGAS	: de l'anglais « <i>cyclic GMP-AMP Synthase</i> »
CMV	: cytomégalovirus
CpG	: cytosine-Phosphate-Guanine
CPV	: cyclopropavir
dNTP	: désoxyribonucléoside triphosphate
E	: de l'anglais « <i>early gene</i> » (gène précoce)
FBA	: de l'anglais « <i>filter-based assay</i> »
FCV	: famciclovir
FDA	: de l'anglais « <i>food and drug administration</i> »
FOS	: foscarnet
FOS ^R	: résistant au foscarnet
FOS ^S	: sensible au foscarnet
G-Luc	: Gaussia Luciférase
GCV	: ganciclovir
GCV ^R	: résistant au ganciclovir
GCV ^S	: sensible au ganciclovir
HP	: hélicase-primase
HVEM	: de l'anglais « <i>herpesvirus entry mediator</i> »
IE	: de l'anglais « <i>immediate-early gene</i> » (gène précoce immédiat)
IFN	: interféron
IL	: interleukine
IRF	: de l'anglais « <i>IFN Regulatory factor</i> »

ISG	: de l'anglais « <i>interferon-stimulated genes</i> »
ITC	: de l'anglais « <i>isothermal titration calorimetry</i> »
L	: de l'anglais « <i>late gene</i> » (gène tardif)
LAT	: de l'anglais « <i>latency-associated transcripts</i> »
LTV	: letermovir
MAVS	: de l'anglais « <i>mitochondrial antiviral signaling</i> »
MBV	: maribavir
MDA5	: de l'anglais « <i>melanoma differentiation-associated gene 5</i> »
miARN	: micro acide ribonucléique
mTOR	: de l'anglais « <i>mammalian target of rapamycin</i> »
MyD88	: de l'anglais « <i>Myeloid Differentiation primary response 88</i> »
NEC	: de l'anglais « <i>nuclear export complex</i> »
NFκB	: de l'anglais « <i>Nuclear Factor κB</i> »
NIEP	: de l'anglais « <i>noninfectious enveloped particule</i> »
NK	: de l'anglais « <i>natural killer</i> »
PAMP	: de l'anglais « <i>pathogen-associated molecular pattern</i> »
PCR	: de l'anglais « <i>polymerisation chain reaction</i> »
PCV	: penciclovir
PPi	: pyrophosphate inorganique
PRR	: de l'anglais « <i>pattern recognition receptor</i> »
RIG-I	: de l'anglais « <i>retinoic acid inducible gene-1</i> »
RLR	: de l'anglais « <i>retinoic acid inducible gene-1 like receptor</i> »
RRM	: de l'anglais « <i>RNA recognition motif</i> »
RTCA	: de l'anglais « <i>real time cell analysis</i> »
SEM	: de l'anglais « <i>skin, eyes and mucosal</i> »
Sp1	: de l'anglais « <i>specificity protein 1</i> »
SRAS-CoV-2	: coronavirus 2 du syndrome respiratoire aigu sévère
STEM	: de l'anglais « <i>scanning transmission electron microscopy</i> »
STING	: de l'anglais « <i>stimulator of interferon genes</i> »
TCSH	: transplanté de cellules souches hématopoïétiques
TK	: thymidine kinase
TLR	: de l'anglais « <i>toll-like receptor</i> »
TNF	: de l'anglais « <i>Tumor Necrosis Factor</i> »
TOS	: transplanté d'organe solide
TRIF	: de l'anglais « <i>Toll/IL-1R domain-containing adaptor-inducing IFN-β</i> »
UL	: séquence unique longue
US	: séquence unique courte
UV	: ultra-violet
VACV	: valaciclovir
VEB	: virus Epstein-Barr

VEE	: de l'anglais « <i>Venezuela equine encephalitis</i> »
VGCV	: valganciclovir
VHH	: virus herpès humain
VHS	: virus herpès simplex
VIF	: virus de l'immunodéficience féline
VSV	: virus de la stomatite vésiculaire
VVZ	: virus de la varicelle et du zona
VIH	: virus de l'immunodéficience humaine
vMIA	: de l'anglais « <i>viral mitochondrial inhibitor of apoptosis</i> »
vICA	: de l'anglais « <i>viral inhibitor of caspase-8-induced apoptosis</i> »

Remerciements

Merci à toute l'équipe du Dr. Guy Boivin pour cette organisation et gestion, pour les nombreux repas partagés ainsi que vos connaissances techniques et surtout pour votre soutien. Je tiens surtout à remercier Jocelyne; pour toutes ces années de doctorat... Un énorme merci aux étudiants de l'équipe et amis; pour ces moments de discussion, de craquage, de danse et de folie; de merveilleux souvenirs inoubliables. Je remercie également tous nos collaborateurs qui ont participé aux différents projets de ma thèse; merci à Andréa Allaire, Van Dung Pham, Xiaojun Zhu ainsi qu'au Dr. Martin Bisailon et au Dr. Rong Shi.

De nombreux amis m'ont soutenu durant ce doctorat, vous êtes ma famille de Québec, je commencerai par les anciens qui ont partagé leur expérience du doc, de leur vie ici et celle d'après...merci aux vieux Sages du CRI. Ce groupe des Sages me fait penser à toi ma cousine libanaise, un énorme merci pour ton soutien après ton départ, ta grande sagesse et patience !! Merci à mon ami et voisin de cubicule pour ton soutien techni-thé et distribution de Guru, une grande découverte pour moi durant toutes ces années et une véritable nécessité pour ma sérénité; merci d'avoir partagé tes grandes passions. Merci à mon autre voisine des cubicules mais surtout amie avec qui j'ai tellement partagé ces dernières années, pour tes précieux conseils, nos marches, sorties, déménagements, en espérant découvrir d'autres îles avec toi... Merci également à tous les étudiants des cubicules, de mettre de la vie dans nos bureaux; merci à cacofonix pour tes merveilleuses mélodies et tous ces précieux moments partagés à Québec, les déménagements de la vache, les expéditions foireuses mais aussi ces moments partagés avec tes merveilleux amis. Pour ne pas oublier les étudiants qui m'ont accueilli à Québec, Rafik et Coraline, merci de m'avoir guidé et aidé à mon arrivée à Québec. À mon grand fan de Chuck Norris, tu es un peu dans toutes les catégories : vieux Sages du CRI même si tu n'es pas si Sage et de nouveau membre des cubicules, je te remercie car tu as toujours eu les mots pour remonter le moral et toujours été partant pour mes expéditions à la boulangerie !! Merci à toi titi, d'être venue de si loin pour faire la "*reporter*" de l'extrême...nos vies ont bien évolué depuis le collège, merci pour ces décennies d'amitiés, je nous en souhaite encore de nombreuses. Also, I want to thank you my dear friend Noopur for supporting me during our travels, during the PhD trip...for all our discussions, walks and sharings. I hope that our plans go well and that we'll meet somewhere soon...

Québec a été le point de croisement de routes de nombreuses personnes qui me sont très chères; et c'est le cas de ma petite « *galera* », merci pour toutes ces années de soutien, de lutte, de partage, de discussions interminables, de découvertes du Québec et d'ailleurs, de vos cultures, expressions, des musiques de motivation que je ne citerai pas ici, de vos votes et soutien pendant le confinement, pour tant d'autres choses...à tous ces moments inoubliables; un énorme merci à vous deux. La vie loin de la famille est difficile et vous l'avez rendue plus douce.

La dernière partie de mes remerciements est consacrée à TOUTE ma famille qui m'a soutenu de loin toutes ces années, pour tous ces appels vidéo, de m'avoir permis d'être présente à distance. Un énorme merci à ma tante Nassera, mon petit frère, ma « sœur » et ses enfants que j'ai vus grandir à distance et qui m'ont tant apporté. Ma mère et ma tante qui m'ont permis de faire une pause et de voyager pendant mon doctorat...j'ai partagé de merveilleux moments inoubliables avec vous deux. Mes très chers parents sans qui je n'aurais pu être au Québec ces dernières années...de m'avoir soutenu, poussé et motivé toutes ces années dans des moments parfois difficiles. Merci à vous deux.

Avant-propos

Le cytomégalo­virus humain (CMV) et le virus herpès simple­x 1 (VHS-1) m’interpellent en raison de leurs caractéristiques particulières telles que leur capacité à établir la latence à vie au sein de leur hôte, leur potentiel à échapper au système immunitaire mais surtout pour leur capacité à répliquer un génome d’aussi grande taille. Cette dernière particularité est possible grâce à leur ADN polymérase qui est fiable et qui permet à ces virus de répliquer leur génome, et qui est par conséquent, la cible principale des antiviraux approuvés dans le traitement des infections à CMV et VHS-1 et également le sujet de mon doctorat.

L’introduction de ma thèse résume les différents points essentiels de la littérature qui concernent ces deux virus herpétiques. Le mémoire de thèse débute par une présentation générale du CMV et du VHS-1 ainsi que des membres de la famille des *Herpesviridae*, des manifestations cliniques qui leur sont associées et de la réponse immunitaire de l’hôte suite à une infection par ces virus. Par la suite, j’aborde les outils dont on dispose actuellement pour prévenir ou traiter ces infections et ceux qui sont en cours d’études. Finalement, la dernière partie fait un état des lieux de nos connaissances sur la résistance du CMV et du VHS-1 aux antiviraux et des outils dont nous disposons pour étudier les mécanismes impliqués.

Le chapitre 1 présente l’hypothèse globale de mon projet de recherche de doctorat et les différents objectifs qui en découlent.

Les trois chapitres suivants présentent les résultats obtenus au cours de mon doctorat :

- Le chapitre 2 présente notre article « *Impact of Amino Acid Substitutions in Region II and Helix K of HSV-1 and HCMV DNA Polymerases on Resistance to Foscarnet* » publié dans « *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* » en 2021 (DOI : 10.1128/AAC.00390-21) et est présenté dans ce chapitre sous sa version finale. Les expériences ont été conçues et réalisées par K. Zarrouk sous la supervision et les conseils de J. Piret et G. Boivin. L’article a été rédigé par K. Zarrouk et corrigé par J. Piret et G. Boivin. N. Goyette a participé à la génération de certains deuxièmes clones des VHS-1 recombinants. La modélisation tridimensionnelle des ADN pol sous différentes conformations a été réalisée par notre collaborateur le Dr. R. Shi et ses étudiants V. Dung Pham et Xiaojun Zhu du département de biochimie, microbiologie et de bio-informatique à l’Université Laval.

- Le chapitre 3 correspond à un article publié en 2020 dans le journal « *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* » (DOI: 10.1128/AAC.01910-19) et avait pour but de caractériser la mutation Q579I (hélice K) en comparaison avec la mutation K805Q (hélice P) associées à une hypersensibilité du CMV au FOS. Il est présenté dans ce chapitre sous sa version finale. Les expériences ont été conçues et réalisées par K. Zarrouk sous la supervision et les conseils de J. Piret et G. Boivin. L'article a été rédigé par K. Zarrouk et corrigé par J. Piret et G. Boivin. La modélisation tridimensionnelle des ADN pol sous différentes conformations a été réalisée par notre collaborateur le Dr. R. Shi et son étudiant V. Dung Pham du département de biochimie, microbiologie et de bio-informatique à l'Université Laval.
- Le chapitre 4 présente un de nos projets dont l'objectif était d'analyser l'impact différentiel de mutations au codon 715 dans la région II de l'ADN pol (V715G/M/S) du CMV et du VHS-1; les résultats font l'objet d'un article publié en 2021 dans le journal « *Antiviral Research* » (DOI 10.1016/j.antiviral.2021.105046) et est présenté dans ce chapitre sous sa version finale. Les expériences ont été conçues et réalisées par K. Zarrouk sous la supervision et les conseils de J. Piret et G. Boivin. L'article a été rédigé par K. Zarrouk et corrigé par J. Piret et G. Boivin. N. Goyette a réalisé la génération du deuxième clone du virus recombinant VHS-1 possédant la mutation V715S. La modélisation tridimensionnelle des ADN pol sous les conformations ouvertes et fermées a été réalisée par notre collaborateur le Dr. R. Shi et son étudiante Xiaojun Zhu du département de biochimie, microbiologie et de bio-informatique à l'Université Laval.

Le dernier chapitre entame une discussion plus générale de ma thèse et de l'importance de l'étude des mécanismes de résistance du CMV et du VHS-1 aux antiviraux.

Finalement, après une conclusion générale de la thèse, se trouve en annexe une revue que j'ai eu l'opportunité de rédiger avec la Dre Jocelyne Piret et le Dr Guy Boivin peu de temps après le début de mon doctorat. Cette revue porte sur les ADN pol du CMV et du VHS-1, plus précisément sur leur structure, leurs fonctions et la résistance aux antiviraux induites par des mutations localisées dans les gènes qui codent pour les ADN pol de ces virus.

INTRODUCTION

Partie I : Les *Herpesviridae*

En 2008, l'ordre des Herpesvirales fut créé sur base de l'analyse des séquences nucléotidiques de six gènes viraux [1, 2]. Cet ordre viral regroupe trois familles de virus dont les *Herpesviridae* (qui infectent les humains, les oiseaux et les reptiles), les *Alloherpesviridae* (qui ont pour hôtes les amphibiens et les poissons) et les *Mallacoherpesviridae* (qui infectent les bivalves) [1, 2]. Au sein des *Herpesviridae*, il existe plus de 200 virus dont certains peuvent infecter plusieurs hôtes [3] (Figure 1). Tous les virus herpétiques ont en commun un génome sous forme d'ADN linéaire double brin dont la taille varie entre 125-236 kbp, une capside icosaédrique de triangulation T=16 et un tégument qui correspond à une structure protéineuse entouré par une enveloppe virale.

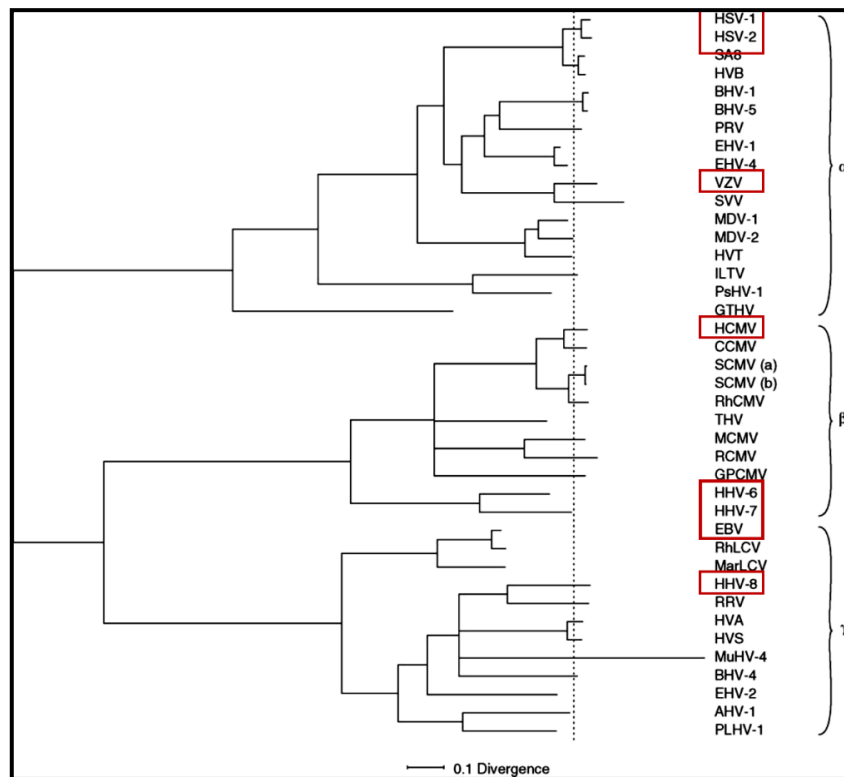


Figure 1 : Arbre phylogénétique des *Herpesviridae* représentant 40 virus de cette famille. Cet arbre phylogénétique a été obtenu après alignement des séquences de six gènes (orthologues des protéines UL15, UL19, UL27, UL28, UL29 et UL30 du virus herpès simplex 1) de ces virus. Les virus herpétiques humains sont encadrés en rouge. Provenant et adapté de [4].

I- Généralités sur les virus herpétiques humains

Quatre propriétés biologiques sont spécifiques des *Herpesviridae*; i) ils sont capables d'établir la latence à vie au sein de l'hôte, ii) ils induisent la lyse des cellules infectées, iii) leur réplication virale ainsi que l'assemblage de la nucléocapside ont lieu dans le noyau et iv) leurs gènes encodent un large éventail d'enzymes qui permettent la synthèse de l'ADN viral, le métabolisme des acides nucléiques, ainsi que la maturation des protéines [3]. Les *Herpesviridae* sont divisés en trois sous-familles en fonction de la durée de leur cycle de réplication, le site de latence et les cellules cibles (Tableau 1).

Ces trois sous-familles regroupent neuf virus herpétiques humains. Les virus appartenant aux *Alphaherpesvirinae* ont un large spectre d'hôtes et un cycle viral court, induisent la lyse des cellules infectées et ont la capacité d'établir la latence dans les ganglions sensitifs et les nerfs crâniens [3]. Les *α -herpesvirinae* comprennent les virus herpès simplex 1 et 2 (VHS-1/-2) ainsi que le virus de la varicelle et du zona (VVZ).

Les *Betaherpesvirinae*, quant à eux, induisent un grossissement des cellules infectées et ont un cycle viral plutôt long, environ 5 jours pour le cytomegalovirus humain (CMV) [5]. De plus, ils établissent leur latence au sein des lymphocytes T, des macrophages, des monocytes et d'autres cellules [6]. La sous-famille des *β -herpesvirinae* regroupe le CMV, les virus herpès humains 6A/B et 7 (VHH-6A/B et VHH-7).

Les virus de la famille des *Gammaherpesvirinae* ont un cycle répliatif lent et sont spécifiques aux lymphocytes T et B; ils établissent leur latence dans les tissus lymphoïdes [3]. Cette sous-famille contient le virus Epstein-Barr (EBV) et le virus herpès humain 8 (VHH-8).

Tableau 1 : Classification des virus herpétiques humains et principales manifestations cliniques associées, leurs cellules cibles et leurs sites de latence.

	Sous-famille	Genre Nom usuel (abréviation/nom taxonomique)	Principales pathologies associées	Cellules cibles	Sites de latence
HERPESVIRIDAE	α-herpesvirinae	Virus herpès simplex 1 (VHS-1/VHH-1)	Ulcères oro-labiaux et génitaux Infections oro-pharyngées Encéphalites Kératites	Épithéliales des muqueuses	Ganglions trijumeaux et sacrés Nerfs crâniens et sensitifs
		Virus herpès simplex 2 (VHS-2/VHH-2)	Ulcères génitaux et oro-labiaux Infections néonatales		
		Virus de la varicelle et du zona (VVZ/VHH-3)	Varicelle et zona		
	β-herpesvirinae	Cytomegalovirus (CMV/VHH-5)	Syndrome mononucléosique Rétinite Pneumonie Hépatite Infections congénitales	Épithéliales Monocytes Lymphocytes	Monocytes Lymphocytes
		Virus de la roséole (VHH-6A/B)	Roséole Hépatite Pneumonie Encéphalite	Lymphocytes T Monocytes Macrophages Cellules épithéliales, endothéliales et hématopoïétiques Microglies Oligodendrocytes Astrocytes	Monocytes Macrophages
		Virus de la roséole (VHH-7)	Roséole Encéphalite	Lymphocytes T CD4+	Lymphocytes T
	γ-herpesvirinae	Virus Epstein-Barr (VEB/VHH-4)	Mononucléose Lymphome Carcinome nasopharyngé	Épithéliales Lymphocytes B	Lymphocytes B mémoires
		Virus associé au sarcome de Kaposi (VHH-8)	Sarcome de Kaposi Maladie de Castleman	Lymphocytes T Cellules endothéliales	Lymphocytes B Cellules endothéliales

II- Le cytomégalovirus humain et le virus herpès simplex 1

A-Structure morphologique

La taille des virus herpétiques varie entre 120 et 260 nm. Ils sont constitués d'un génome sous forme d'ADN double brin (db) linéaire protégé par une capsidie icosaédrique. Le tégument dans lequel baigne la capsidie contient une variété de protéines qui exercent leurs fonctions dès l'entrée du virus dans la cellule hôte. Il s'agit de virus enveloppés dont la membrane provient de la cellule hôte infectée et contient des glycoprotéines virales à sa surface qui permettent l'interaction avec des récepteurs cellulaires.

1) Capsidie du CMV et VHS-1

Les virus herpétiques partagent certaines caractéristiques au niveau de leur structure. Leur capsidie est sous la forme d'un icosaèdre constitué de 162 capsomères qui protège le génome viral (Figure 2). La triangulation de la capsidie est de 16 (T) constitués de 12 pentons, 150 hexons et 320 triplexes [7]. Il existe trois sortes de capsides : A- qui ne contiennent pas d'ADN ni de protéines d'échafaudage, B- qui possèdent tout le squelette d'un virion mais ne renferment pas le génome et C- qui contiennent l'ADN viral [8, 9]. La capsidie du CMV renferme un génome de 235 kbp alors que celle du VHS-1 contient un ADN de 152 kbp. La capsidie du CMV mesure 130 nm et n'est que 5% plus large que celle du VHS-1 alors qu'elle renferme un génome plus grand [5]. Plusieurs protéines virales ont été identifiées comme participant à la formation des capsides du CMV et du VHS-1. Les protéines UL46, UL48.5, UL85 et UL86 sont les principaux constituants de la capsidie du CMV [5, 10]. Pour le VHS-1, les principales protéines de la capsidie sont UL18, UL19, UL35, UL38 ainsi que la protéine UL6 qui forme le portail [9, 11-14].

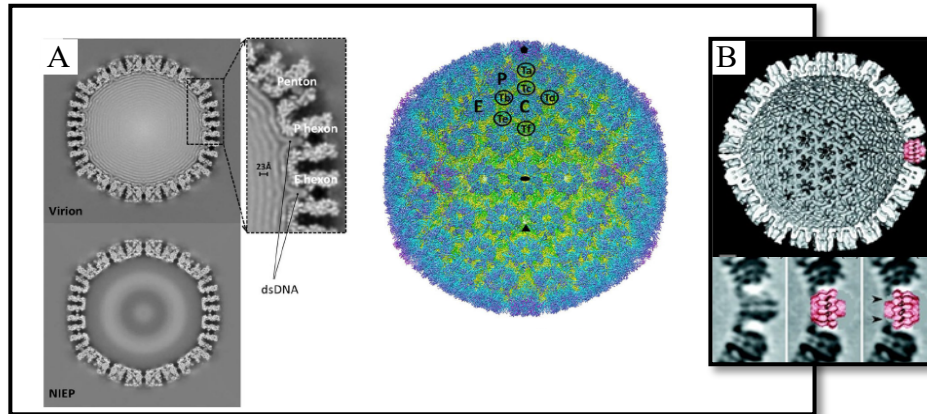


Figure 2 : Représentation des capsides du CMV (A) et du VHS-1 (B).

(A) Reconstruction par cryo-microscopie électronique d'une coupe d'un virion en haut et d'une particule virale non infectieuse en bas (NIEP). Au centre, il s'agit d'une reconstruction colorée d'une capside du CMV. (B) Section d'une modélisation de la capside du VHS-1 montrant en rose le portail. Provenant et adapté de [7, 15].

Il est à noter qu'il existe différentes nomenclatures pour une même protéine virale. En effet, au cours du temps, les protéines virales ont été nommées en fonction de différentes caractéristiques, telles que leur migration sur un gel dénaturant (« *Virion Protein* » ou « *Infected Cell Protein* »), leur poids moléculaire (« *Viral Molecular Weight* »), leur fonction ainsi que la position du gène qui les encode dans le génome [3]. À titre d'exemple, la protéine du tégment du VHS-1 nommée VP16 est également dénommée ICP25, vmw65, α -TIF (« *α -Trans-Inducing-Factor* ») ainsi que UL48 car elle est encodée par le gène *UL48*.

2) Particularités de l'enveloppe et du tégment du CMV

Tel que mentionné dans les généralités sur les virus herpétiques, l'enveloppe du CMV dérive de la cellule hôte et provient soit du réticulum endoplasmique, soit des membranes endosomales [9]. L'enveloppe du CMV contient principalement trois complexes protéiques. D'une part, les glycoprotéines gB, qui sont liées de manière covalente et forment des dimères, jouent un rôle dans la fusion ainsi que dans l'entrée du virus dans la cellule hôte [16]. Après attachement aux héparanes sulfates, les glycoprotéines gB permettent la fusion au niveau de la membrane plasmique ou endosomale et *in fine* l'entrée dans la cellule hôte. D'autre part, les glycoprotéines gM et gN qui sont impliquées dans la maturation des particules virales forment un deuxième complexe [17]. Le troisième complexe est composé d'hétérodimères des glycoprotéines gH et gL qui peuvent orienter le type cellulaire que le virus infecte en fonction des protéines qui leur sont associées [18, 19]. Ainsi,

lorsque la glycoprotéine gO est associée à ce complexe, le tropisme cellulaire est orienté vers les cellules fibroblastiques alors qu'une association avec les protéines UL128-UL131 favorise un tropisme endothélial et épithélial [20-22].

Le tégment renferme environ 38 protéines identifiées à ce jour, dont certaines sont d'origine cellulaire, ainsi que des microARN (miARN) [5, 18]. Parmi les protéines virales retrouvées dans le tégment, plusieurs sont des trans-activateurs (UL71, UL69, TRS1 (« *Terminal Repeat Short* »), IRS1 (« *Internal Repeat Short* ») [23-27]. Les différentes fonctions des protéines du tégment n'ont pas toutes été déterminées mais certaines sont très importantes pour les premières étapes de l'infection. Ainsi, la protéine UL71 (pp71) codée par le gène *UL82* va entrer dans le noyau tout de suite après la pénétration du virus dans la cellule hôte et activer la transcription des gènes viraux précoces en modulant la machinerie de transcription cellulaire [28]. La protéine UL83 (pp65), codée par le gène *UL83*, est très abondante dans le tégment et permet au virus de moduler la réponse cellulaire dès le début de l'infection virale [18]. De plus, les protéines retrouvées dans le tégment ont des rôles associés à la maturation de la particule virale et à l'assemblage des différents éléments du virion en fin de cycle [24].

3) Particularités de l'enveloppe et du tégment du VHS-1

Tout comme pour le CMV, l'enveloppe du VHS-1 dérive des membranes de la cellule hôte. De nombreuses protéines sont associées à l'enveloppe virale. Les glycoprotéines gD, gB et le complexe gH/gL sont les principales impliquées dans l'attachement aux récepteurs cellulaires et la fusion membranaire (section Entrée du VHS-1 dans la cellule hôte). D'autres glycoprotéines ont été identifiées à la surface du VHS-1, il s'agit des protéines gC, gE, gI, gK, gM, gJ et gN.

Le tégment contiendrait 24 protéines virales qui vont permettre d'initier la transcription virale, de moduler la réponse cellulaire et qui peuvent également être impliquées dans l'assemblage et la maturation de la particule virale [29]. Ainsi, la protéine VP16 largement connue pour son rôle d'induction de la transcription des gènes viraux est retrouvée dans le tégment et va pouvoir directement agir après l'entrée du virus dans la cellule en pénétrant dans le noyau [30].

B- Organisation génomique

Le génome viral est constitué d'un ADN db linéaire qui se circularise dans le noyau de la cellule hôte. En considérant uniquement les virus herpétiques humains, la taille du génome varie de 125 à 236 kpb. Les virus herpétiques sont divisés en six groupes génomiques (A à F) en fonction de l'arrangement des séquences de ces virus [31]. Le CMV ainsi que le VHS-1 appartiennent au groupe E et leur génome est constitué d'une séquence unique longue (U_L) ainsi que d'une séquence unique courte (U_S). Ces séquences U_L et U_S sont entourées à chaque extrémité de séquences répétées en un nombre variable de fois et qui peuvent s'inverser, ce qui mène à la présence de quatre isomères équimolaires (Figure 3).

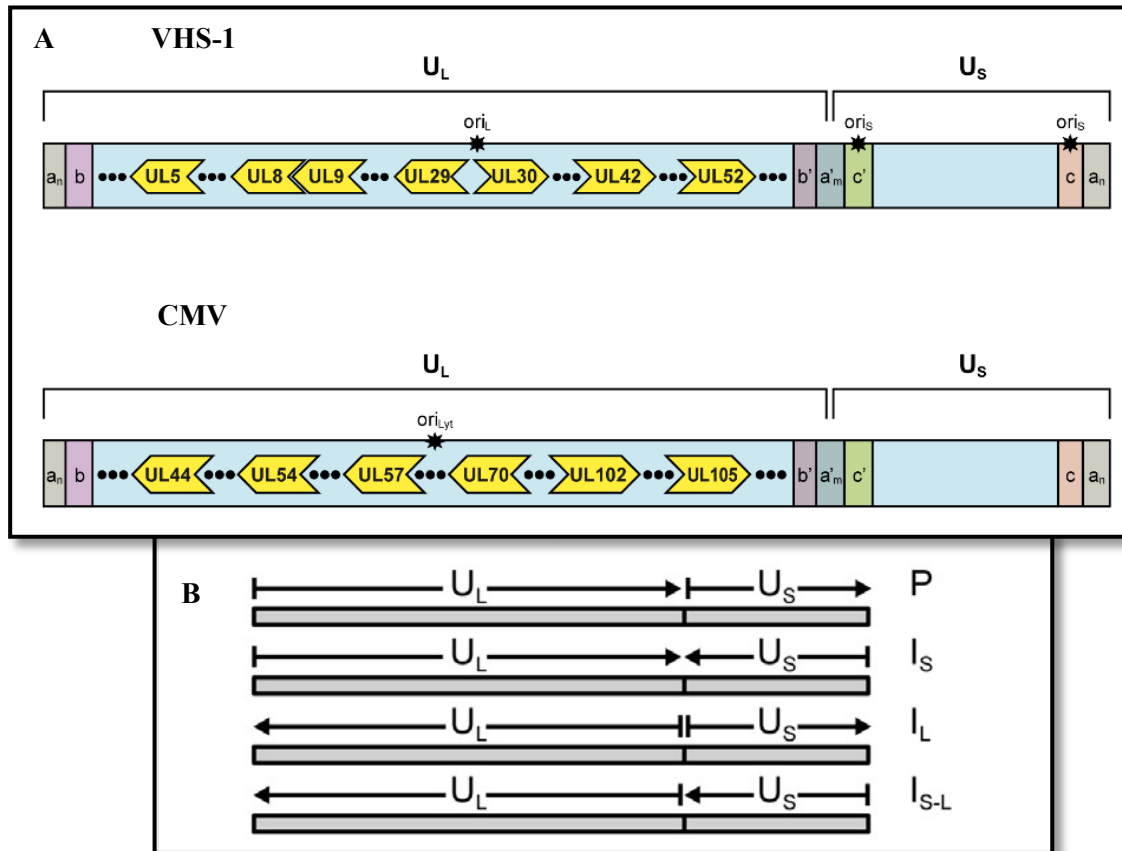


Figure 3 : Organisation génomique du VHS-1 et du CMV.

Le génome du VHS-1 et du CMV contient une région unique longue (U_L) ainsi qu'une région unique courte (U_S) (A). U_L est entourée des séquences répétées a_n et b ainsi que des séquences répétées inversées a'_m et b' . De même, la région U_S est entourée de la séquence inversée répétée c' et des séquences répétées c et a_n . Du fait de ces séquences répétées, quatre isomères possibles sont observés (B). L'isomère P est le prototype, I_S a la région U_S inversée, I_L possède une région U_L inversée et I_{S-L} a les 2 régions inversées. Provenant et adapté de [32].

C- Un cycle réplcatif commun au sein des virus herpétiques

Le cycle réplcatif complet du CMV et du VHS-1 se déroule en quatre grandes étapes; l'entrée de la particule virale dans la cellule hôte, la transcription des gènes viraux, la réplcation du génome viral puis la sortie du virion (maturation, assemblage et bourgeonnement de la nouvelle particule virale).

1) Entrée du CMV et du VHS-1 dans la cellule hôte

a) Entrée du CMV dans la cellule hôte

L'entrée du CMV dans la cellule hôte reste encore aujourd'hui le sujet de nombreuses recherches. Ce qui est indéniable est que le mécanisme d'entrée va dépendre de la cellule hôte. Lors de travaux récents qui visaient à étudier l'entrée du virus en utilisant la tomographie STEM (« *Scanning Transmission Electron Microscopy* »), différentes observations ont été faites résultant des interactions entre la cellule hôte et le virus [33]. Ainsi, les particules virales sont retrouvées à proximité de la cellule hôte dont la membrane se courbe au contact du virus en formant des protrusions cellulaires de type macropinocytose mais également des renflements de membrane cellulaire (Figure 4). Nrp2 (« *Neuropilin-2* ») et PDGFR α (« *Platelet-derived growth factor receptor alpha* ») sont les deux récepteurs du CMV identifiés à ce jour; cependant, de nombreuses autres protéines jouent un rôle dans l'entrée du virus comme CD90 et CD13 [34]. Le contact avec la cellule hôte se ferait également *via* des interactions entre les protéoglycanes héparanes sulfates de la cellule hôte et les glycoprotéines virales [16]. De plus, l'entrée dans la cellule implique des mécanismes de fusion des membranes virales et cellulaires. Les protéines virales gB et le complexe gH/gL sont impliqués dans les processus d'attachement et de fusion de la particule virale qui conduisent *in fine* à la libération de la particule virale dans le cytoplasme. Par la suite, la capsid va pouvoir migrer jusqu'au noyau où la transcription du génome viral se déroule.

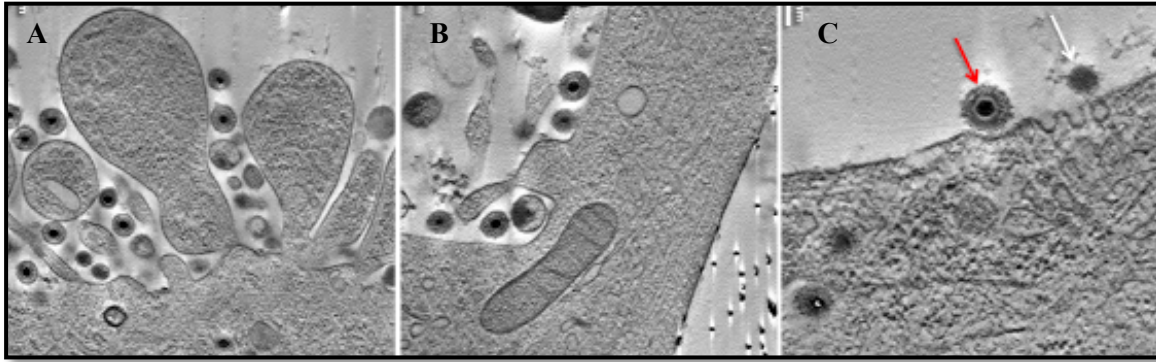


Figure 4 : Entrée du CMV dans la cellule hôte.

(A) Reconstitution par tomographie d'une cellule infectée par le CMV avec de nombreuses particules virales dans des renflements de la membrane cellulaire; (B) Particules virales présentes dans des protrusions cellulaires de type macropinocytose; (C) Une particule virale (flèche rouge) et un corps dense (flèche blanche) près d'une membrane qui se courbe. Provenant de [33].

b) Entrée du VHS-1 dans la cellule hôte

L'entrée du VHS-1 dans la cellule hôte peut se faire *via* deux mécanismes; i) la membrane plasmique de la cellule et l'enveloppe du virus fusionnent, ce qui induit le relargage de la particule virale dans le cytoplasme, ii) le virus entre par endocytose et les membranes de l'endosome et du virus fusionnent, ce qui libère la particule virale dans le cytoplasme [29, 35] (Figure 5). Le mécanisme d'entrée du virus dans la cellule hôte dépendrait du type cellulaire, mais les protéines virales impliquées seraient les mêmes. Cependant, les mécanismes régissant l'orientation du type cellulaire sont peu connus. L'initiation de l'attachement du virus à la cellule se ferait *via* les héparanes sulfates, mais d'autres récepteurs semblent également être impliqués [29]. Ainsi, les glycoprotéines virales gC et/ou gB interagissent avec les héparanes afin d'initier l'entrée du virus dans la cellule; cette étape n'est cependant pas suffisante à elle seule pour permettre l'entrée [36]. La protéine gD a plusieurs récepteurs dont certains types d'héparanes sulfates, nectin-1 et un récepteur de la famille des TNF (HVEM; « *Herpesvirus Entry Mediator* ») [37-39]. Lors de la fusion, la protéine gD se lie au récepteur présent sur la cellule cible, ce qui induit un changement de conformation du complexe gH/gL qui va interagir avec gB. Finalement, cette interaction permet d'activer la protéine de fusion gB qui rapproche les deux membranes et finalise la fusion [40].

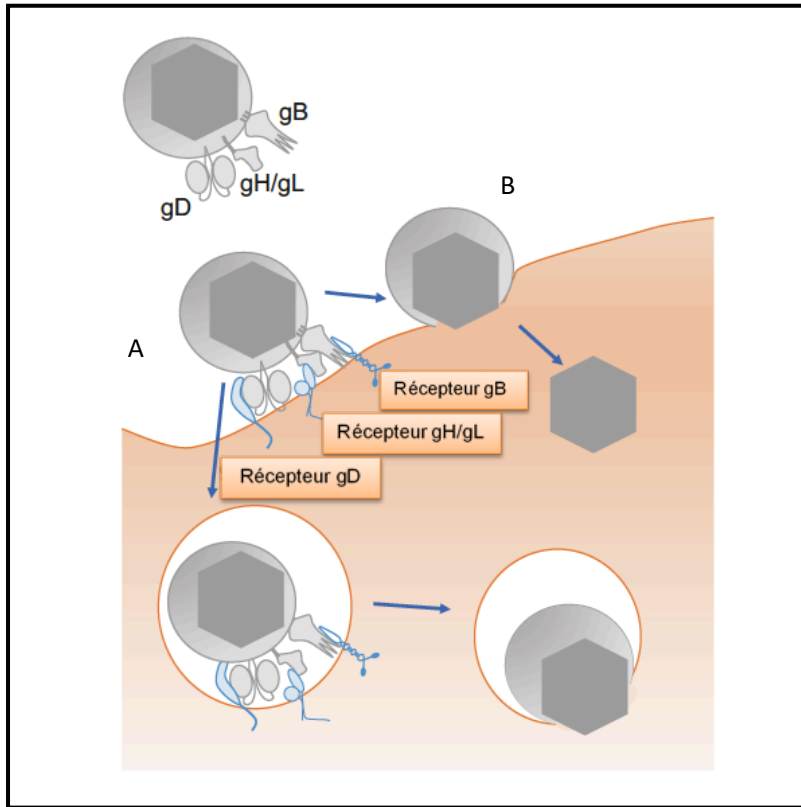


Figure 5 : Entrée du VHS-1 dans la cellule hôte.

L'entrée du virus dans la cellule hôte peut se faire par deux mécanismes soit une fusion avec la membrane plasmique (A) ou avec la membrane endosomale (B) et se termine par la libération de la capsid dans le cytoplasme. Provenant et adapté de [29].

2) Transcription séquentielle des gènes viraux

La transcription des gènes du CMV et du VHS-1 est séquentielle et dépendante de l'ARN polymérase II de la cellule hôte [3]. Ainsi, la transcription de groupes de gènes varie en fonction du temps (Figure 6). Les gènes précoces immédiats α , également nommés gènes IE (« *Immediate-early genes* »), sont transcrits en premier et ne dépendent pas de la transcription des gènes précoces β et tardifs γ . Les gènes α codent pour des protéines régulatrices de l'expression des gènes β . Les transcrits vont sortir du noyau pour être traduits dans le cytoplasme par les ribosomes cellulaires. Les gènes β sont divisés en 2 sous-classes, soit les gènes $\beta 1$ et $\beta 2$. La majorité de ces gènes codent pour les protéines virales nécessaires à la réplication virale comme l'ADN polymérase (pol) codée par les gènes *UL54* (CMV) et *UL30* (VHS-1). Dans un dernier temps, ce sont les gènes tardifs γ qui sont transcrits. Ils sont également divisés en 2 sous-classes : les gènes $\gamma 1$ et $\gamma 2$. Les gènes γ codent pour des protéines ayant un rôle dans la maturation et l'assemblage des nouvelles particules virales.

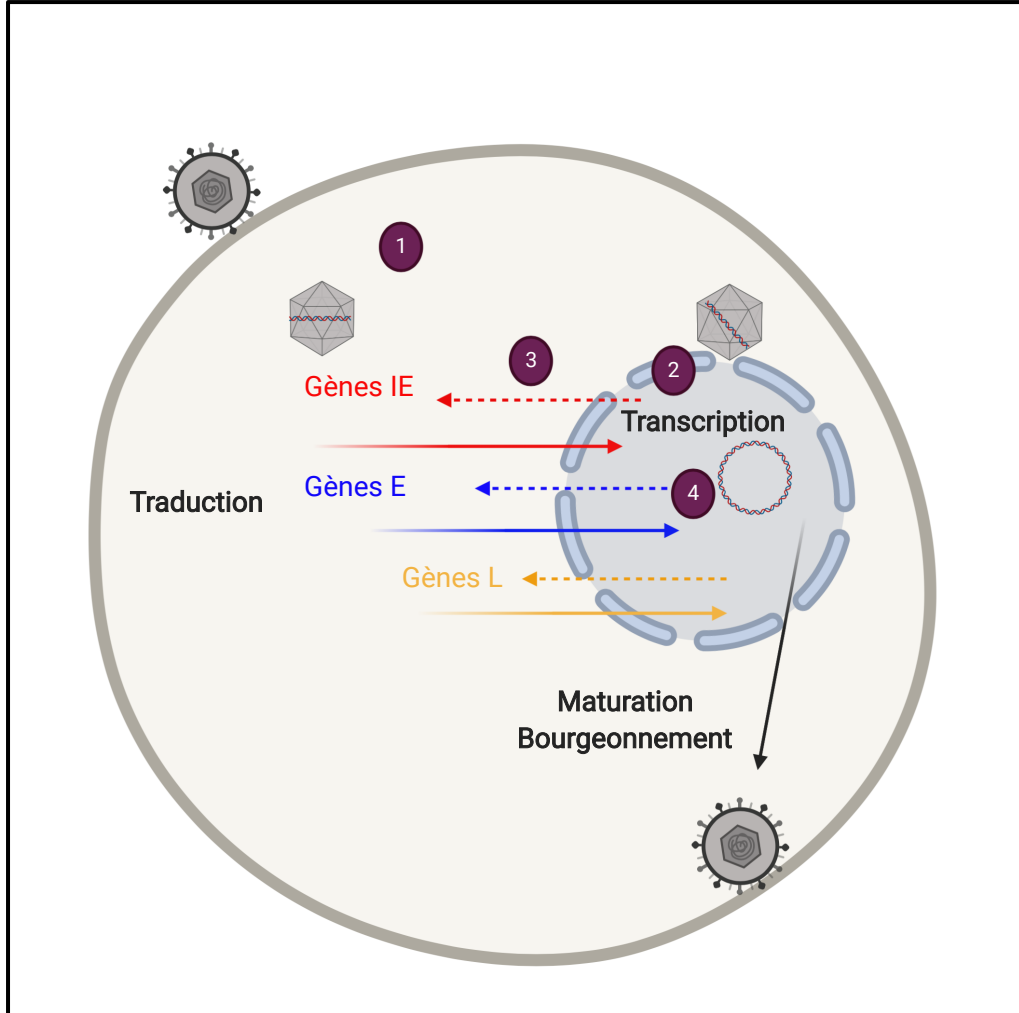


Figure 6 : Représentation du cycle viral du CMV et du VHS-1.

Le cycle viral du CMV et du VHS-1 débute par l'entrée du virus (1) dans la cellule hôte suivie de la pénétration de l'ADN viral dans le noyau où le génome se circularise (2). Par la suite, il y a transcription séquentielle du génome en commençant par les gènes IE, puis E et finalement L (3). Les ARNm sont traduits dans le cytoplasme, puis les protéines sont transloquées dans le noyau. En fin de cycle, il y a encapsidation du génome dans le noyau et maturation et bourgeonnement de la particule virale (4). Réalisé sur Biorender.com.

3) Réplication du génome viral

La réplication du génome viral permet de reproduire de nombreuses copies de l'ADN viral qui vont par la suite être incorporées dans des capsides néo-synthétisées. La synthèse d'ADN a lieu

dans le noyau et implique un complexe de réplication dont la sous-unité catalytique est l'ADN pol, soit UL54 (CMV) et UL30 (VHS-1).

a) Réplication du CMV

Une des particularités du génome du CMV est qu'il possède un seul site d'origine de réplication Ori_{Lyt} localisé entre les gènes *UL57* et *UL69* [41-43]. Le complexe de réplication du CMV possède six protéines virales : la protéine de liaison à l'ADN simple brin UL57, le complexe hélicase-primase constitué des protéines HP1-HP2-HP3 (codées respectivement par les gènes *UL105*, *UL70* et *UL102*), l'ADN pol UL54 et son facteur de processivité UL44 (Figure 7). L'initiation de la réplication du génome du CMV impliquerait l'activité du promoteur de Ori_{Lyt} et des homomultimères UL84 ainsi que de l'hétérodimère IE2-p86 [44, 45]. UL84 recruterait le complexe UL54-UL44 au site d'initiation de la réplication. Comme pour le VHS-1, la réplication en cercle roulant semble être un des mécanismes de synthèse de l'ADN du CMV.

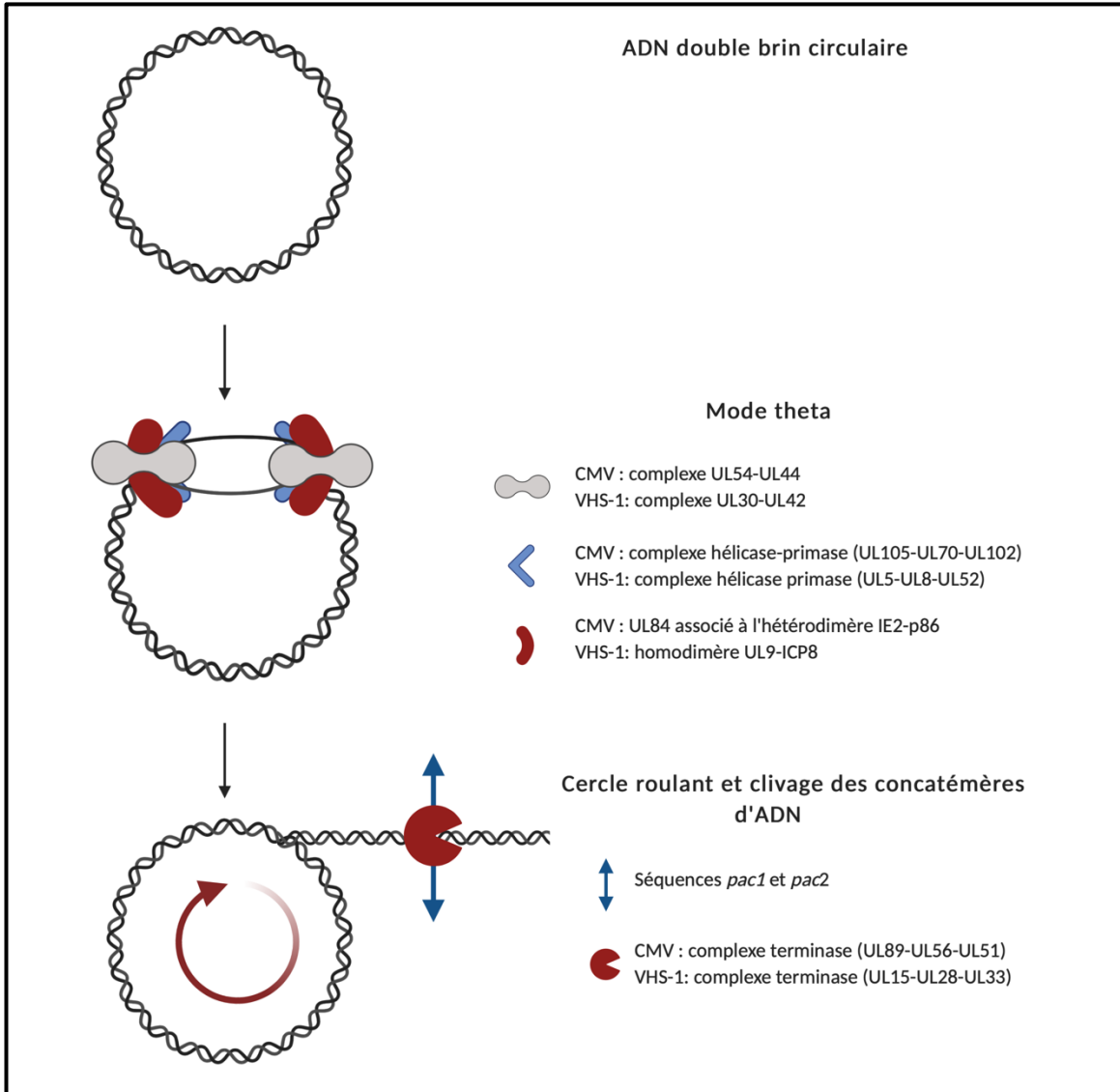


Figure 7 : Réplication du CMV et du VHS-1.

Après circularisation de l'ADN dans le noyau, le complexe UL84 et IE2-p86 serait responsable de l'initiation de la réplication du génome du CMV. Concernant le VHS-1, les homodimères d'UL9 initieraient la réplication du génome viral en se liant aux origines de réplication. ICP8 est recrutée, ce qui permet d'augmenter l'activité hélicase d'UL9. Par la suite, les complexes hélicase-primase et ADN pol-facteur de processivité sont recrutés. Finalement, la réplication se déroulerait selon un mode theta puis par le mécanisme de cercle roulant qui aboutit à la production de longs concatémères clivés au niveau des séquences *pac* par les complexes terminases. Adapté de [46, 47] et réalisé sur Biorender.com.

b) Réplication du VHS-1

L'initiation de la réplication se fait au niveau des sites d'origine de réplication présents en trois exemplaires dans le génome du VHS-1. En effet, le génome du VHS-1 possède deux copies de sites Ori_S au niveau du segment court et un site Ori_L localisé entre les gènes *UL29* et *UL30* présents dans le segment long (Figure 2) [48, 49]. Le complexe de réplication du VHS-1 est composé de sept protéines virales : la protéine de liaison aux origines de réplication UL9, le complexe hélicase-primase formé par les protéines UL5-UL8-UL52, l'ADN pol UL30 et son facteur de processivité UL42 ainsi que la protéine ICP8 qui lie l'ADN simple brin [50] (Figure 7). L'initiation de la réplication serait induite par la protéine UL9 qui en se liant à une des trois origines de réplication induit une distorsion et le déroulement de l'ADN, son activité hélicase est augmentée à la suite de la liaison de la protéine ICP8 [51]. À ce stade, le génome est sous une forme theta puis la réplication se poursuivrait par un mécanisme de cercle roulant aboutissant à la production de longs concatémères [52, 53].

4) Encapsidation, maturation et bourgeonnement

Les longs concatémères synthétisés sont clivés au niveau de séquences nommées *pac* par le complexe de la terminase qui est formé par les protéines UL89-UL56-UL51 (CMV) et UL15-UL28-UL33 (VHS-1) [54, 55]. Par la suite, les concatémères clivés qui forment les copies du génome viral vont être encapsidés dans des nouvelles capsides virales. L'encapsidation d'un monomère d'ADN dans une capside est régulée également par le complexe de la terminase. L'entrée du génome viral dans la capside se fait à travers le portail de la capside. La protéine UL56 du CMV interagit avec la protéine portail UL104 de la capside, ce qui va permettre l'entrée du génome dans la procapside. Les protéines virales du VHS-1 impliquées dans l'encapsidation du génome viral sont les protéines du complexe terminase ainsi que les protéines UL17 et UL25 [9]. Cette étape d'encapsidation se déroule dans le noyau. La capside sort du noyau et migre vers le cytoplasme grâce au complexe de sortie nucléaire NEC (« *Nuclear Export Complex* »). Une fois dans le cytoplasme, il y a maturation de la particule virale par acquisition du tégument et de l'enveloppe virale au cours du bourgeonnement.

D- La latence, une caractéristique des virus herpétiques

Au cours de la latence, le génome viral persiste sous forme épisomale et ne s'intègre pas au génome de l'hôte. Une fois au site de latence, le virus va réprimer progressivement l'expression des gènes dits lytiques et activer celle des gènes LAT (« *Latency-Associated Transcripts* »).

Le virus peut se réactiver sous l'action de différents stimuli, tels que les rayons UV, la fièvre, le stress, etc... Cependant, les mécanismes impliqués dans le processus de réactivation ne sont pas très bien déterminés.

1) Latence du CMV

Le CMV établit sa latence dans les progéniteurs myéloïdes CD34⁺ de la moelle osseuse et les monocytes CD14⁺ du sang [56, 57]. Le promoteur MIEP est réprimé au cours de la latence afin de diminuer l'expression des gènes lytiques et les gènes LAT sont exprimés [58]. La réactivation du CMV impliquerait la différenciation des progéniteurs myéloïdes en macrophages et en cellules dendritiques induite par un environnement pro-inflammatoire [59-61].

2) Latence du VHS-1

Après infection des cellules épithéliales en périphérie, le virus peut rester en état de latence dans les ganglions sensitifs et les neurones. Pour cela, la capsid virale va remonter le long de l'axone par transport rétrograde (Figure 8). Comme pour le CMV, les gènes lytiques sont également réprimés et l'expression des LAT est induite. Les gènes LAT sont localisés au niveau des régions flanquant le segment long du génome viral. Lors de la phase de latence, le virus va exprimer de nombreux miARN impliqués dans l'évasion du système immunitaire, ce qui lui permet de rester non détectable. En effet, plusieurs miARN vont permettre de réprimer l'expression d'ICP0 et d'autres protéines dont ICP34.5, et possiblement ICP4 [62]. Il a également été montré que le virus exprime à très bas niveau des protéines virales mais que la surveillance mise en place par le système immunitaire maintiendrait le virus sous sa forme latente [63]. La réactivation a lieu suite à l'expression des gènes impliqués dans la phase lytique du cycle viral.

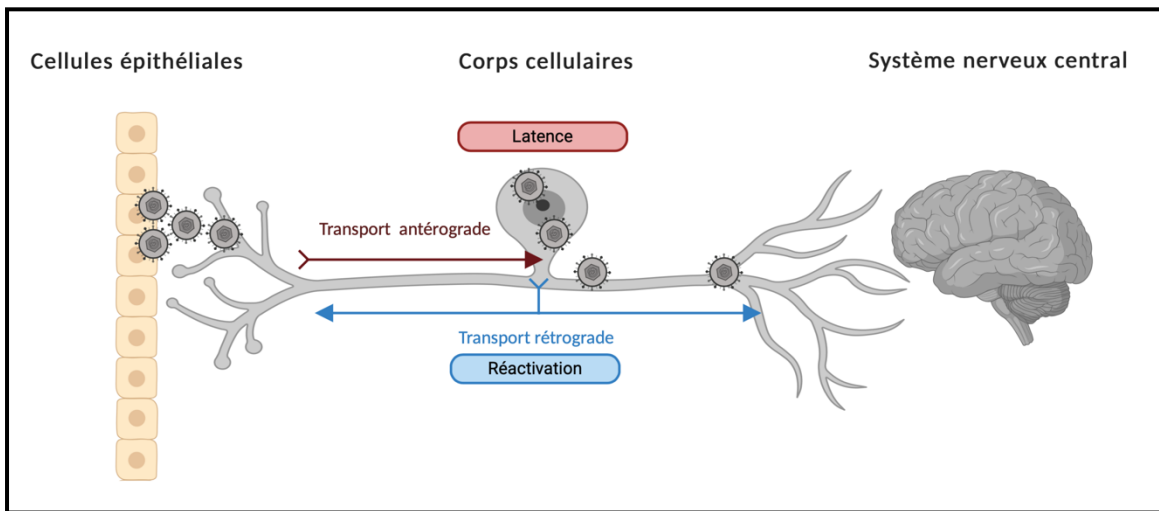


Figure 8 : Représentation de l'établissement de la latence du VHS-1 dans les ganglions sensitifs et réactivation.

Suite à une primo-infection dans les cellules épithéliales, le virus établit sa latence dans les ganglions sensitifs et les neurones *via* un transport antérograde. Lors de la réactivation, le virus rejoint le site de primo-infection par un transport rétrograde et peut dans certains cas être transporté vers le système nerveux central. Adapté de [64] et réalisé sur Biorender.com.

III- Les ADN polymérases, enzymes indispensables à la réplication

A-Généralités sur les ADN pol de la famille B

Il existe sept classes d'ADN pol, A, B, C, D, X, Y et RH [65, 66]. Cette classification est basée sur l'analyse des séquences nucléotidiques des gènes codant pour ces enzymes et à leurs homologues de structure [67]. Les virus herpétiques codent pour leurs propres ADN pol qui appartiennent à la classe B et à la sous-famille α . Les ADN pol B regroupent également les ADN pol δ , ϵ , ζ ainsi que les ADN pol des bactériophages T4 et RB69 (Figure 9) [65]. Les enzymes appartenant à cette classe possèdent une activité 3'-5' exonucléase qui leur permet de corriger les erreurs dans l'ADN en cours d'élongation [68].

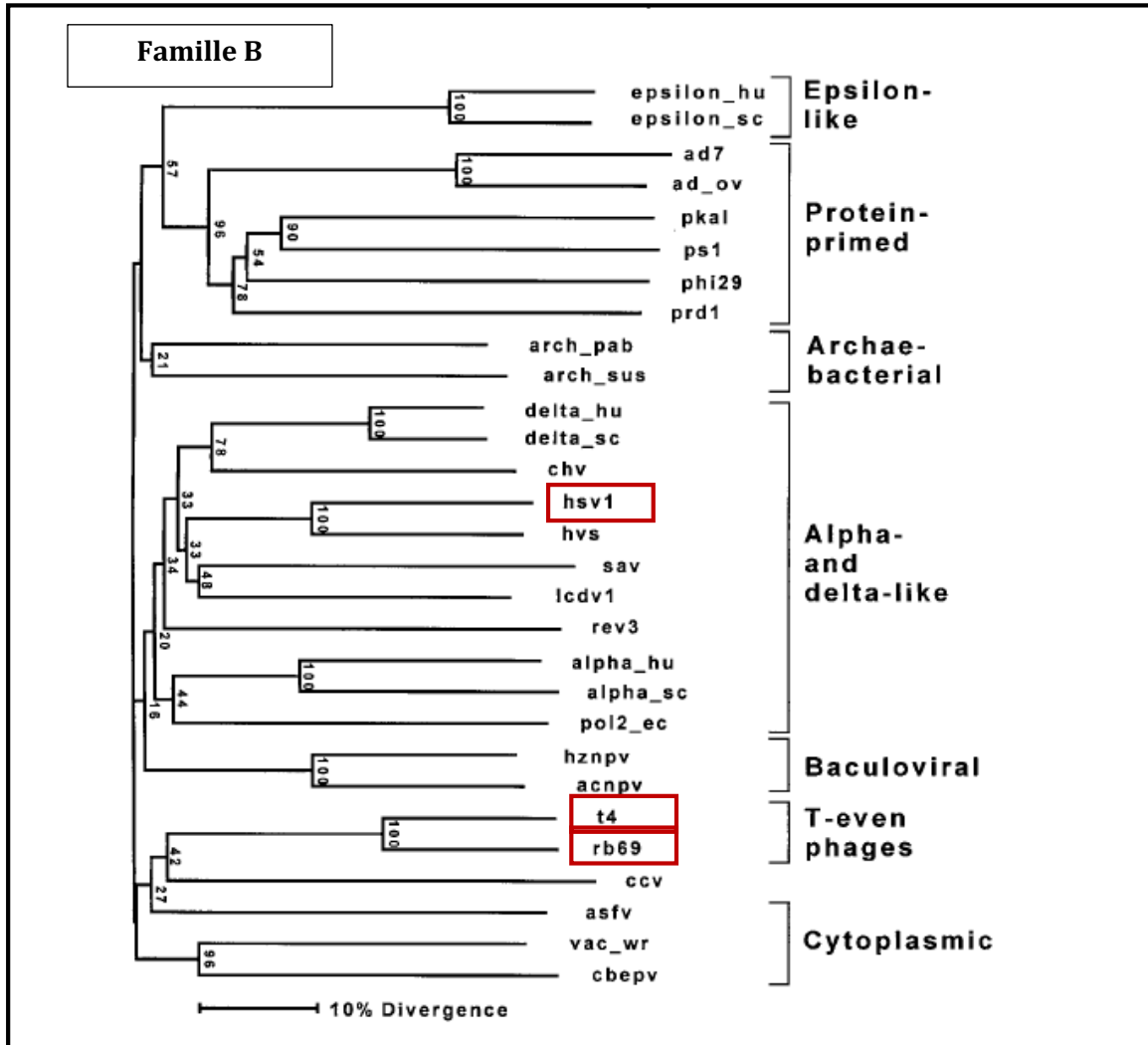


Figure 9 : Arbre phylogénétique des ADN pol B.

Les ADN pol de la famille B qui ont été cristallisées et qui sont mentionnées dans cette thèse sont encadrées en rouge, soit celle du VHS-1 et celles des bactériophages RB69 et T4. Provenant et adapté de [69].

B- UL54 et UL30, ADN pol du CMV et du VHS-1

La structure des ADN pol du CMV et du VHS-1 comprend huit domaines conservés au niveau de leur région catalytique. Ces domaines sont notés de I à VII en fonction du pourcentage décroissant d'homologie. Il existe également un domaine δ -region C, partagé avec les ADN pol eucaryotiques δ . De plus, les ADN pol UL54 et UL30 possèdent un domaine exonucléase qui contient les motifs ExoI, ExoII et ExoIII.

Le gène *UL54* code pour l'ADN pol du CMV, UL54 (1242 acides aminés). UL54 possède un facteur de processivité, UL44 (433 acides aminés), encodé par le gène *UL44*. Des homodimères d'UL44 se forment et interagissent avec l'extrémité C-terminale d'UL54. Les homodimères d'UL44 forment une structure en C-clamp qui permet d'encercler et de lier l'ADN. La dimérisation d'UL44 semble importante pour la réplication de l'ADN virale [70].

L'ADN pol du VHS-1 (1235 acides aminés) est encodée par le gène *UL30*. UL30 possède également un facteur de processivité, UL42 (488 acides aminés), qui lui permet d'augmenter sa processivité bien que cette enzyme soit capable de polymériser des milliers de nucléotides sans se dissocier du brin modèle [67]. UL30 et UL42 forment un hétérodimère en interagissant au niveau de l'extrémité C-terminale d'UL30. De plus, il a été démontré qu'UL42 peut se lier au duplex ADN [67]. UL42 augmente l'efficacité de l'activité de polymérisation en maintenant l'interaction entre l'ADN en cours d'élongation et l'enzyme. En effet, l'interaction d'UL42 à l'ADN est très importante et il a été montré que des mutations dans le gène *UL42* ont un impact sur la liaison à l'ADN, ce qui conduit à une altération de la synthèse d'ADN [67, 71].

C- Activités des ADN pol du CMV et du VHS-1

Les ADN pol sont des enzymes qui possèdent une activité de polymérisation qui permet l'élongation du brin d'ADN nouvellement synthétisé. UL54 et UL30 possèdent également une activité de correction « *proofreading* » grâce à son activité 3'-5' exonucléase [72, 73]. Ainsi, ces enzymes ont la capacité de corriger l'incorporation d'un nucléotide incorrect grâce à leur activité exonucléase. Il a été montré que pour UL30 cette activité augmente la fidélité de la réplication virale de 39 fois [74]. UL30 a une activité RNase H qui permet de retirer les brins d'ARN utilisés pour les fragments d'Okazaki [67, 73].

Partie II : Manifestations cliniques, diagnostic et immunologie

I- Manifestations cliniques associées au cytomégalovirus humain

Deux voies de transmission du CMV existent : on distingue la transmission horizontale, d'un individu infecté à un individu sain, de la transmission verticale qui définit le passage du virus de la femme enceinte infectée à son fœtus/nouveau-né. La transmission horizontale se fait par les fluides corporels contaminés soit au niveau de la salive, des urines, du sperme, des sécrétions cervicales ainsi que des larmes. Il existe plusieurs modes de transmission verticale, soit une transmission intra-utérine, lors de l'accouchement et lors de l'allaitement.

A- Infections chez les personnes immunocompétentes

Les infections à CMV sont en général asymptomatiques ou sont associées à des mononucléoses à CMV qui se caractérisent par de la fièvre, des maux de tête, des malaises et de la fatigue [75]. D'autres symptômes peuvent être rarement observés chez les patients immunocompétents dont des arthralgies, un syndrome de Guillain-Barré, des myocardites, des anémies hémolytiques, des rétinites, des pneumonies, des pathologies intestinales et des hépatites.

B- Infections chez les personnes immunosupprimées

Lors d'une suppression immunologique induite pharmacologiquement dans le cadre d'une transplantation d'organes solides, il est possible d'observer des primo-infections ou des réactivations du virus associées à des maladies à CMV. Le risque de maladies à CMV est le plus élevé lorsque la sérologie du receveur est négative et celle du donneur est positive (R-/D+) [76]. Les symptômes les plus communément observés sont la fièvre, des malaises, des éruptions cutanées ainsi que des arthralgies [77]. En fonction de l'organe transplanté, des symptômes plus spécifiques associés aux maladies à CMV sont observés comme des myocardites, des rétinites, des colites, des pneumonies, des hépatites et une inflammation des reins [75].

Malgré les avancées de ces dernières années et la forte diminution du taux de décès dû aux maladies associées au CMV, les patients transplantés de cellules souches hématopoïétiques (TCSH) ont un risque élevé de développer des symptômes importants après la transplantation. Le risque est plus élevé lorsque le receveur est séropositif et le donneur séronégatif (R+/D-) [31, 78]. Le risque de mortalité d'un patient ayant développé une virémie à CMV au cours de l'année qui suit la transplantation est augmenté de 2 fois environ comparativement à un patient sans virémie ou avec une faible virémie [79, 80]. Actuellement, les manifestations cliniques les plus fréquemment observées sont des troubles intestinaux (90% des pathologies) ainsi que des pneumonies.

Les patients sidéens font parties des personnes immunosupprimées qui sont à risque de développer des maladies à CMV. Depuis la mise en place du traitement HAART (« *Highly Active antiretroviral therapy* »), en 1996, les maladies à CMV ont fortement diminuées chez les patients sidéens. Cependant, les rétinites à CMV restent une des principales complications des patients sidéens qui ont une maladie à un stade avancé (nombre de cellules $CD4^+ < 50/mm^3$) et peut aboutir à une perte de la vue [81, 82].

C- Infections congénitales

Les infections congénitales associées au CMV (CCMV) sont majoritairement asymptomatiques (85-90%) mais font parties des principales causes d'infections congénitales associées à un virus [83]. Cependant, 10% des nouveau-nés infectés par le CMV présentent des symptômes cliniques et 40-60% de ceux-ci auront des séquelles à vie [84]. Les conséquences pour le fœtus dépendent du trimestre de la grossesse lors de l'infection CCMV. Une primo-infection symptomatique de la mère qui a lieu en début de grossesse est associée à un taux de mortalité autour de 10% [85]. La transmission transplacentaire lors d'une primo-infection est beaucoup plus élevée (35%) comparé à une réactivation ou à une réinfection par une autre souche (1,1-1,7%) [86-89]. La transmission de la mère au fœtus est plus importante au cours du 3^{ème} trimestre mais induit des séquelles à long terme moins graves pour le fœtus comparativement à une infection qui a lieu en début de grossesse [89].

Une primo-infection se manifeste chez la mère par des symptômes assez communs comme la fièvre, des malaises, des maux de tête et des symptômes plus révélateurs comme une splénomégalie, une lymphadénopathie, une hépatosplénomégalie, des éruptions cutanées et de l'arthralgie. Lors d'une transmission au fœtus, les CCMV peuvent se manifester entre autres par des calcifications cérébrales, une microcéphalie, une hépatomégalie et un défaut de croissance intra-utérine [86, 90].

Les symptômes causés par une CCMV chez le nouveau-né sont la jaunisse, des pétéchies, une microcéphalie et une hépatosplénomégalie [91]. Les conséquences les plus fréquentes à long terme sont une diminution ou la perte de l'audition et des retards mentaux.

D-Diagnostics des infections à CMV

La culture cellulaire du CMV doit être réalisée sur des fibroblastes humains, est longue (environ deux semaines) et de moins en moins pratiquée au profit des analyses génotypiques qui sont beaucoup plus rapides. L'ADN du CMV est détecté par une réaction de polymérisation en chaîne (PCR) à partir de différents échantillons (sang, plasma, biopsie de tissus). La présence de l'antigène pp65 peut également être recherchée pour confirmer une infection à CMV mais également pour faire le suivi d'un traitement antiviral et pourrait être utile dans l'initiation d'un traitement préemptif qui consiste à faire le suivi d'un patient à risque de développer une infection à CMV et de le traiter dès les premiers signes d'apparition d'une charge virale [75, 92].

Lors d'une suspicion d'une infection à CMV chez une femme enceinte, plusieurs approches diagnostiques peuvent être mises en place. Des analyses sérologiques de la mère sont réalisées afin de déterminer s'il s'agit d'une primo-infection ou d'une réactivation. La présence d'anticorps IgM suggère une primo-infection bien que ceux-ci puissent persister plusieurs mois. C'est pour cela qu'il est désormais recommandé de réaliser un test d'avidité des IgG [89]. De plus, si l'échographie révèle des anomalies comme une calcification cérébrale, une ventriculomégalie, la présence d'un intestin hyperéchogène ou une anasarque foeto-placentaire, des analyses complémentaires sont recommandées à partir du liquide amniotique pour rechercher la présence du génome du CMV.

II- Manifestations cliniques associées au VHS-1

Une étude épidémiologique réalisée en 2012 rapportait que 67% de la population mondiale était infectée par le VHS-1 [93]. Il est difficile d'établir la prévalence exacte du nombre de personnes infectées étant donné que, dans la majorité des cas, les infections au VHS-1 sont asymptomatiques ou non rapportées. Dans de rares cas, des infections plus sévères et disséminées sont associées au VHS-1. La transmission du virus se fait d'un individu infecté à un autre par un contact étroit d'une peau lésée ou d'une muqueuse à une autre muqueuse présentant des lésions et excréant le virus, par la salive et lors de rapports sexuels.

A- Infections oro-labiales

Lors d'une primo-infection, on peut observer des prodromes qui peuvent se manifester sous la forme de fièvre, de malaises, de maux de tête, de nausées et de vomissements. Par la suite, des vésicules et des ulcères vont se développer dans la cavité buccale et peuvent évoluer en gingivite. Lors des réactivations, il est fréquent d'observer des ulcères au niveau des lèvres qui sont communément appelés boutons de fièvre ou feu sauvage.

B- Infections oculaires

Les infections oculaires représentent moins de 5% des primo-infections. Elles sont majoritairement associées à des récurrences [94]. Une infection par le VHS-1 peut causer une infection de la cornée (kératite), de la rétine, une inflammation de la paupière (blépharite), des conjonctivites ainsi que des iridocyclites (inflammation de l'iris et des corps ciliaires). Bien que majoritairement asymptomatiques, les infections oculaires peuvent être assez sérieuses dépendamment de l'atteinte des tissus et du statut immunitaire de la personne infectée.

C- Infections génitales

Les infections génitales sont majoritairement associées à une infection par le VHS-2 mais également de plus en plus par le VHS-1. En 2012, il a été estimé que 140 millions de personnes âgées de 15 à 49 ans avaient développé un herpès génital associé au VHS-1 contre une estimation globale de 417 millions pour le VHS-2 [93]. Les infections génitales peuvent également être asymptomatiques ou être associées avec des lésions, telles que des papules, des ulcères, des macules et pustules au niveau des muqueuses génitales.

D- Infections néonatales induites par le VHS-1

L'herpès néonatal est une infection rare mais aux conséquences dramatiques avec un taux de mortalité pouvant atteindre 60% si l'infection n'est pas traitée. Les infections les plus graves surviennent lorsque la mère développe une primo-infection au cours de la grossesse et varient selon le trimestre auquel la personne est infectée [47]. Il est estimé que 30% des infections néonatales peuvent conduire à une atteinte du système nerveux central et 25% à une infection disséminée. La

majorité des cas est due à une transmission du virus excrété au niveau du tractus génital lors de l'accouchement. Les infections pendant la grossesse restent rares du fait de la protection immunitaire de la mère. En effet, les IgG de la mère conférant une protection contre l'infection peuvent traverser le placenta et ainsi protéger le bébé pendant la grossesse [95]. Les infections néonatales sont associées à des lésions de la peau, des yeux et des muqueuses également regroupés sous le nom de maladie SEM (« *Skin, Eyes and Mucosal* ») [47].

E- Encéphalites herpétiques

L'incidence des encéphalites herpétiques est d'environ 1 pour 100,000 à 150,000 personnes [96]. En l'absence de traitement antiviral, le taux de mortalité est de 70%. Malgré l'administration de l'antiviral acyclovir (ACV), ce taux reste élevé et avoisine les 25%. Suite à une encéphalite herpétique, des séquelles neurologiques sont fréquemment observées [97]. La majorité des encéphalites herpétiques sont causées par le VHS-1. Par contre, les nouveau-nés sont à risque de développer des encéphalites herpétiques associées au VHS-2 et au VHS-1 contractés lors de l'accouchement [47]. Il n'est pas encore très bien établi comment le virus infecte le système nerveux central [97].

F- Infections chez les personnes immunosupprimées

Les personnes immunosupprimées et infectées par le VHS-1 ont un risque plus élevé que les personnes immunocompétentes de développer des symptômes sévères avec des récurrences fréquentes et des infections disséminées. La sévérité des infections au VHS-1 va dépendre du traitement immunosuppresseur ou de l'intensité du déficit immunitaire causé par une maladie. Les transplantés d'organes solides (TOS) (reins, cœur, foie) ou de moelle osseuse ont un risque élevé de développer une infection au VHS-1 [47]. Si le patient receveur est positif pour le VHS-1, il est à risque de développer une infection herpétique sévère. Des transmissions du virus à un patient transplanté avec un organe provenant d'un donneur positif pour le VHS-1 ont également été rapportées [47]. Avant la trithérapie, les patients sidéens présentaient un risque élevé de développer une infection sévère à VHS-1, persistante et disséminée. Cependant, depuis la mise en place de la trithérapie contre le VIH, il y a une diminution de la proportion de patients sidéens à risque de développer une réactivation du VHS-1. Il est à noter que ces patients sont toujours à risque de développer des pathologies sévères, telles que des hépatites et des pneumonies [98, 99]. Le temps nécessaire pour la guérison est également plus long chez les patients immunosupprimés et peut

atteindre jusqu'à six semaines, ce qui peut conduire à une résistance du VHS-1 aux antiviraux utilisés (voir section sur la résistance aux antiviraux) [47, 100].

G-Diagnostics des infections causées par le VHS-1

Lors d'une suspicion d'une infection au VHS-1, des diagnostics phénotypiques et/ou génotypiques peuvent être réalisés en laboratoire. Les échantillons utilisés pour le diagnostic des infections à VHS-1 proviennent principalement des lésions observées (cutanées et des muqueuses) mais aussi des différentes régions où le virus peut se répliquer en fonction du type d'infection (génitale, orale, oculaire, sang, plasma, liquide céphalorachidien). Il est également possible d'isoler le virus à partir de l'urine, des selles, du nasopharynx, de la gorge et de la conjonctive [47].

La culture du virus sur des cellules permissives à partir des échantillons cliniques est une méthode rapide (apparition des effets cytopathiques en 24-48h) et permet également d'amplifier le virus pour faire d'autres analyses par la suite, telles que la détermination de la sensibilité aux antiviraux ou la détection de nouvelles mutations. Cependant, l'analyse par culture cellulaire est de moins en moins utilisée. Un nouvel outil beaucoup plus sensible et plus rapide est la PCR qui permet à partir des échantillons ou de certaines lésions d'amplifier et de détecter la présence d'ADN viral [47]. Il est possible d'identifier l'ADN du VHS-1 ou 2 en utilisant des amorces spécifiques afin d'orienter le diagnostic.

Les diagnostics cliniques par analyses sérologiques permettent de détecter les IgG ciblant les protéines virales gG-1 et gG-2 du VHS-1 et du VHS-2, respectivement [101]. Cependant, à des temps précoces de l'infection (environ 2 semaines), les IgG ne sont pas détectables et aboutissent à des résultats faux-négatifs. Les tests sérologiques peuvent être utilisés lors d'une primo-infection de la femme enceinte et vérifier/contrôler si les anticorps ont été transmis au fœtus [47].

Lors d'une suspicion d'encéphalite herpétique, la PCR sur un prélèvement de liquide céphalorachidien est l'outil de diagnostic le plus utilisé. Cependant, d'autres examens sont également réalisés comme l'analyse du liquide cérebrospinal afin de détecter des signes d'une inflammation du système nerveux central (augmentation du nombre de leucocytes, globules rouges et protéines), les électroencéphalogrammes et l'imagerie par résonance magnétique pour visualiser les parties du cerveau atteintes par l'infection [102].

III-Réponse immunitaire induite par le CMV et le VHS-1

Lors d'une infection par le CMV et le VHS-1, l'hôte met en place une réponse immunitaire dite innée lorsqu'il s'agit de la première rencontre entre l'hôte et le pathogène et d'une réponse immunitaire adaptative qui est spécifique au pathogène déjà rencontré.

Ainsi, les cellules expriment des PRR (« *Pattern Recognition Receptor* ») qui reconnaissent des éléments particuliers associés aux pathogènes PAMP (« *Pathogen-Associated Molecular Patterns* ») qui vont permettre de déclencher la réponse immunitaire innée. Il existe différentes classes de PRR dont font parties les TLR (« *Toll-Like Receptor* ») qui sont localisés à la surface de la cellule ou au niveau de l'endosome. Les RLR (« *Retinoic acid inducible gene (RIG)-1 Like Receptor* ») sont également retrouvés au niveau du cytosol.

En fonction des PRR impliqués, différentes voies de signalisation vont être activées. Cela mène à la production des interférons (IFN) de type I (α et β) et III (γ) ainsi que des cytokines. Par voie autocrine et paracrine, les IFN vont induire l'expression des ISG (« *Interferon-Stimulated Genes* »), ce qui mène à la synthèse de protéines ayant des propriétés antivirales. Les cellules de l'immunité innée dont les cellules dendritiques (CD), les cellules NK (« *Natural Killer* ») ainsi que les macrophages sont également recrutées au site d'infection suite à la synthèse de chimiokines.

A-L'immunité innée en réponse aux infections par CMV et VHS-1

Le récepteur TLR2 reconnaît les glycoprotéines de surface du CMV (gB et gH) ainsi que celles du VHS-1 dont la protéine gD, ce qui va activer la voie NF- κ B (« *Nuclear Factor κ B* ») et aboutir à la production de chimiokines et de cytokines inflammatoires, telles que le TNF- α (« *Tumor Necrosis Factor- α* ») et l'interleukine (IL)-6 [103-105] (Figure 10). Les TLR3 et TLR9 sont des récepteurs localisés au niveau des endosomes qui reconnaissent les ARN db et les îlots CpG (Cytosine-Phosphate-Guanine) non méthylés présents sur l'ADN db, respectivement. Dans le cas d'infections par le CMV ou le VHS-1, ces récepteurs vont permettre d'activer la voie IRF3 (« *IFN Regulatory factor 3* ») /IRF7, ce qui mène à la production d'IFN-I.

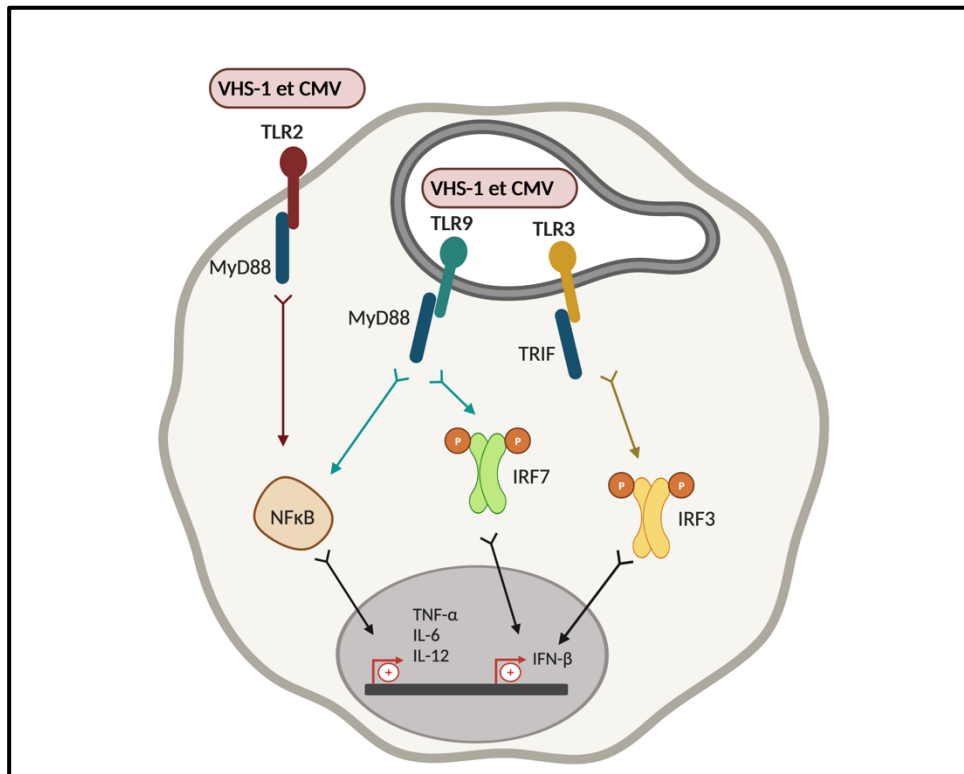


Figure 10 : Voies d'activation induites par les TLR.

Le CMV et le VHS-1 sont reconnus par le récepteur cellulaire TLR2, ce qui va activer la voie NF-κB via MyD88 (« *Myeloid Differentiation primary response 88* ») et activer l'expression des gènes codant pour des chimiokines et cytokines pro-inflammatoires, telles que le TNF-α, l'IL-6 et l'IL-12. Le CMV et le VHS-1 sont reconnus par les récepteurs endosomaux TLR3 et TLR9. TLR9 active deux voies de signalisation via MyD88; d'une part, la cascade de signalisation impliquant NF-κB et d'autre part celle aboutissant à la phosphorylation d'IRF7 et à l'expression d'IFN-I. Le TLR3 induit également l'expression d'IFN-I en activant le facteur de transcription IRF3 via TRIF (« *Toll/IL-1R domain-containing adaptor-inducing IFN-β* »). Adapté de [106] et réalisé sur Biorender.com.

Parmi les RLR, RIG-I et MDA-5 (« *Melanoma Differentiation-Associated gene 5* ») reconnaissent les ARN dans le cytoplasme et activent la protéine MAVS (« *Mitochondrial AntiViral Signaling* »), ce qui aboutit à la production d'IFN-I en passant par la phosphorylation d'IRF3 et d'IRF7 [107].

De plus, l'activation de la voie cGAS (« *cyclic GMP-AMP Synthase* ») -STING (« *stimulator of interferon genes* ») est induite par la reconnaissance de l'ADN db du VHS-1. Cette cascade de

signalisation débute par la reconnaissance de l'ADN db dans le cytoplasme par cGAS qui conduit à la production de cGAMP (« *cyclic guanosine monophosphate - adenosine monophosphate* ») qui se lie à STING au niveau du réticulum endoplasmique, ce qui mène *in fine* à la production d'IFN-I et de cytokines *via* l'activation d'IRF3 et de NF-κB [108].

De plus en plus d'études mettent en avant le rôle des cellules NK dans le contrôle des infections herpétiques. La mise en évidence de cellules NK mémoire a été montrée dans le contexte d'une infection à CMV [109]. Ainsi, l'activation de ces effecteurs et la production de chimiokines et cytokines vont permettre de contrôler l'infection et d'activer la réponse immunitaire adaptative.

B- Les réactivations et le système immunitaire adaptatif

La réponse immunitaire innée permet de guider et d'activer le système immunitaire adaptatif. La mise en place de la mémoire immunitaire sert à contrôler la réplication virale lors des réactivations du CMV et du VHS-1. Un des composants de l'immunité adaptative sont les anticorps neutralisants dirigés contre des antigènes du CMV et du VHS-1 [77, 110]. La réponse cellulaire médiée par les cellules T est très importante dans le contrôle de la réplication virale. Ainsi, les cellules impliquées dans le contrôle de la réplication du CMV sont les cellules T CD4⁺, T CD8⁺ et T-γδ. Du fait de la persistance de ces virus à vie au sein de l'hôte, le système immunitaire est activé en quasi-permanence. Le pourcentage des cellules T circulantes mémoires qui sont orientées pour la défense contre le CMV est important et peut atteindre 40% pour un patient asymptomatique. Ainsi, avec l'âge du patient, il y aurait une accumulation de cellules T dirigées contre le CMV qui pourrait contribuer à l'immunosénescence.

Ainsi, les réponses humorale et cellulaire mises en place pour lutter contre le CMV et le VHS-1 sont des acteurs clés malgré que leur rôle et leur importance ne soient pas complètement élucidés. Des études suggèrent que les anticorps anti-CMV permettraient de limiter la dissémination virale et les manifestations cliniques associées au virus; la réponse cellulaire permettrait quant à elle de contrôler la réplication virale et préviendrait les maladies à CMV [111].

C-L'évasion immunitaire du CMV et du VHS-1

De plus en plus d'études mettent en évidence une co-évolution des virus herpétiques et du système immunitaire de l'hôte. Chez les patients immunocompétents, il existe un équilibre entre le système immunitaire de l'hôte et les mécanismes d'évasion du virus qui permettent d'échapper aux défenses de l'hôte. Ainsi, une des caractéristiques principales de ces virus, la latence, leur permet d'échapper au système immunitaire sans l'activer et de persister au sein de l'hôte. L'implication des cellules NK a été privilégiée par le fait que le génome du CMV code pour des protéines virales dont le rôle est d'empêcher leur activation ou leur action lytique. De nombreuses protéines virales ont été associées à une fonction d'échappement immunitaire. Ainsi, le CMV module l'apoptose, l'activation des cellules NK, favorise un environnement anti-inflammatoire et inhibe la production de cytokines pro-inflammatoires (Tableau 2). Au cours de la phase latente, le CMV exprime des miARN (non antigéniques, pas reconnus par les cellules T) qui vont moduler la réponse immunitaire pendant la phase lytique.

Le VHS-1 possède également de nombreux moyens d'échapper au système immunitaire dont les principaux sont résumés dans le tableau 3. À titre d'exemple, il a été montré que le VHS-1 peut agir sur la voie d'activation des TLR : ainsi, la protéine US3 pourrait bloquer la voie du TLR3 et celle du TLR2 [112, 113]. D'autres protéines agissent également sur la voie des TLR comme ICP0 ou UL37 [114, 115]. Certaines vont moduler l'apoptose cellulaire, alors que d'autres peuvent inhiber l'induction de l'expression des chimiokines et cytokines. Comme pour le CMV, la latence est le moyen le plus efficace pour échapper au système immunitaire et persister à vie au sein de l'hôte.

Tableau 2 : Principaux mécanismes d'évasion du CMV au système immunitaire.

Mécanismes	Protéines virales et autres composants viraux
Latence	Expression des LAT et répression des gènes lytiques Expression de miARN non antigéniques pour les cellules T et permettant d'échapper au système immunitaire
Modulation de l'apoptose	vMIA (« <i>Viral Mitochondrial Inhibitor of Apoptosis</i> »), ARN β 2.7, UL36/vICA (« <i>Viral Inhibitor of Caspase-8-induced Apoptosis</i> »), UL37x1, UL38
Inhibition de l'activité des NK	UL18; gpUL40
Inhibition de la production de cytokines pro-inflammatoires	pp65; IRS1/TRS1; pORF94
Expression de miARN qui module la réponse immunitaire	miR-UL112.1, miR-US4.1, miR-UL148D, miR-US25-2-3p, miR-UL112.3p
Inhibition de la présentation d'antigènes	gpUS2; gpUS3; gpUS6; gpUS11; ppUL83
Expression de protéines virales mimant des protéines de l'immunité	IL-10 virale; UL18 (homologue chaîne lourde de MHC-I); pUS28 (homologue 7TM); vCXC-1/UL146 (homologue IL-8); <i>UL144</i> (homologue TNF)

Tableau 3 : Principaux mécanismes d'évasion du VHS-1 au système immunitaire.

Mécanismes d'évasion immunitaire du VHS-1	
Mécanismes	Protéines virales/<i>Protéines cellulaires</i>
Latence	Expression des LAT et répression des gènes lytiques Expression de miARN dont miARN H6
Modulation de l'apoptose	UL36; gD; gJ, US3; ICP4; ICP27
Dégradation des ARNm cellulaires	vhs (« <i>Virion host shut-off</i> »)
Inhibition de la production de cytokines pro-inflammatoires	ICP0; VP16; γ 34.5; US11; USP7; US3; UL36; ICP6; ICP27
Inhibition de la répression de l'expression des gènes viraux	ICP0
Inhibition de la présentation d'antigènes	ICP47
Détournement de protéines cellulaires	<i>DDx3x</i>

Partie III : Vaccins, traitements et résistance

I-Vaccins

Le développement d'un vaccin reste à ce jour l'outil primordial qui permettrait de prévenir les infections causées par le CMV et le VHS-1. Au cours des dernières années, des progrès ont été accomplis mais aucun vaccin n'est actuellement disponible. Plusieurs types de vaccins ont été testés, tels que décrits ci-dessous.

A-Développement d'un vaccin contre le CMV, une priorité

En 2000, le développement d'un vaccin protégeant contre les infections à CMV a été déclaré être une priorité par l'Institut de médecine des États-Unis [116, 117]. Depuis, plusieurs études cliniques ont été réalisées pour analyser l'efficacité de vaccins potentiels, mais aucun n'a été suffisamment efficace. Cependant, de nombreuses recherches sont en cours afin de développer un vaccin protégeant contre le CMV.

1) Vaccins vivants atténués

Récemment, un vaccin vivant atténué exprimant le complexe pentamérique gH/gL/UL128/130/131 et capable d'induire la production d'anticorps neutralisants a été développé [118]. Ce vaccin contient le génome de la souche AD169 modifié génétiquement dans le but d'altérer sa capacité répliquative. En effet, les protéines IE1/2 et UL51 sont fusionnées au domaine dFKBP (« *destabilizing domain of FK-506-binding protein 12* »), ce qui conduit les protéines au protéasome pour leur dégradation et à une diminution de la réplication virale. Ce vaccin nommé V160 a été évalué en étude clinique de phase I et est considéré sécuritaire et immunogène chez des personnes séronégatives au CMV. D'autres analyses sur le vaccin V160 ont montré qu'il est également capable d'induire une réponse humorale et cellulaire [119]. Une étude clinique de phase II est en cours, la fin est prévue pour juillet 2021 (NCT03486834). Il s'agit donc d'un vaccin prometteur qui a pour but de protéger des infections congénitales à CMV.

2) Vaccins sous-unitaires

Cette classe de vaccins consiste à stimuler la réponse immunitaire dirigée contre un ou des antigènes viraux associés à un adjuvant. Dans le cas du CMV, de nombreuses études ont utilisé la

protéine gB comme facteur immunogène. Ainsi, plusieurs études cliniques de phases I et II ont évalué l'efficacité d'un vaccin associant la protéine gB et l'adjuvant MF59 (émulsion d'huile dans de l'eau) qui permet d'induire une réponse cytotoxique [91]. À titre d'exemple, une étude (de phase II) a montré que le vaccin gB/MF59 était efficace à 50% pour prévenir les primo-infections chez les femmes séronégatives pour le CMV [120]. Cependant, il n'est pas possible de conclure quant à l'efficacité de ce vaccin à prévenir les infections congénitales puisqu'un nouveau-né a été infecté dans le groupe vacciné contre trois dans le groupe placebo. Ainsi, bien que ce vaccin soit sécuritaire et immunogène, son efficacité n'étant pas significative, les études cliniques se sont arrêtées en phase II. Comme décrit à la section particularités du CMV, plusieurs glycoprotéines présentes à la surface du virus favorisent le tropisme vers un certain type cellulaire (mécanisme encore mal connu). Ainsi, les études fondamentales portant sur les mécanismes d'entrée du virus en fonction des cellules cibles permettraient de faire avancer les recherches sur le développement de vaccins.

3) Vaccins à ADN/ARN, particules pseudo-virales et vecteurs viraux

Les vaccins à ADN reposent sur l'expression de plasmides contenant les gènes codant pour des protéines d'intérêts. Une étude clinique de phase III a évalué un vaccin à ADN contenant deux plasmides codants pour les protéines pp65 et gB chez des patients TCSH et TOS. Le vaccin a été considéré sécuritaire et immunogène [91, 121, 122]. Cependant, ces études n'ont pas montré d'efficacité significative dans l'amélioration du taux de survie et des maladies à CMV.

De nouvelles approches sont envisagées dans le développement de vaccins contre le CMV dont un vaccin à ARN [91]. Ainsi, des études ont montré qu'un vaccin à ARN contenant les ARNm codant pour les protéines pp65-IE1 et gB induisent une réponse cellulaire T (CD4+ et CD8+) ainsi que la production d'anticorps neutralisants. De plus, une autre étude clinique de phase II est en cours afin de déterminer l'efficacité et l'immunogénicité d'un vaccin à ARN « *mRNA-1647* » qui contient un ARNm qui code pour la protéine gB et cinq ARNm, pour le complexe pentamérique (NCT04232280). Une étude clinique de phase III est également en cours de préparation afin d'analyser l'efficacité du vaccin « *mRNA-1647* » contre les primo-infections à CMV chez la femme en âge de procréer.

Les particules pseudo-virales ne contiennent pas de génome viral mais présente à leur surface des protéines virales induisant une réponse immunitaire. Une étude clinique de phase I, utilise cette approche vaccinale et est basée sur l'expression de la protéine gB fusionnée à la protéine G du virus de la stomatite vésiculaire (VSV) [123]. Cette étude a montré que le vaccin est sécuritaire et immunogène. Une étude clinique de phase II doit avoir lieu (initialement prévue pour 2019).

Les vecteurs viraux sont de très bons outils pour pouvoir exprimer des antigènes du CMV *via* une autre particule virale. Comme pour les vaccins donnés en exemple dans les sections précédentes, des études de phase I ont été faites en utilisant le virus de l'encéphalite équine du Venezuela (VEE) comme vecteur pour exprimer les protéines pp65-IE1 et gB [124]. Les résultats de cette étude ont montré que les patients ont bien toléré le vaccin. Les protéines recombinantes sont exprimées en grandes quantités et induisent la production d'anticorps neutralisants dirigés contre les trois protéines.

B- Vaccins protégeant contre le VHS-1

De nombreuses tentatives ont également été faites dans le but de développer un vaccin contre le VHS-1. Différentes approches ont été utilisées, telles que des vaccins vivants atténués, des vaccins sous-unitaires, des vecteurs viraux et des particules pseudo-virales [125].

La majorité des vaccins sous-unitaires ont pour facteur immunogène la glycoprotéine de surface gD qui induit une forte réponse en anticorps neutralisants. Ainsi, un vaccin sous-unitaire (gD-2) utilisant la protéine gD du VHS-2 (et un adjuvant composé d'alum et de lipide A monophosphorylé) a été analysé lors d'essais cliniques de phase III, mais celui-ci n'a pas montré d'efficacité globale dans la protection de l'herpès génital associé au VHS-1 ou au VHS-2 [126].

À ce jour, aucun vaccin n'est en cours d'étude clinique. Cependant, des études pré-cliniques semblent prometteuses. Ainsi, une étude réalisée en 2012 sur l'utilisation d'un lentivirus comme vecteur viral semble prometteuse. En effet, le virus de l'immunodéficience féline (FIV) a été utilisé comme vecteur afin de présenter le facteur immunogène gB du VHS-1 (gB-1) [127]. L'efficacité de ce vaccin à prévenir l'herpès génital a été évaluée chez des souris et a montré une efficacité croisée contre le VHS-1 (100%) et le VHS-2 (75%).

Bien que de nombreuses études se soient soldées par des échecs, les recherches effectuées pour mieux comprendre les mécanismes d'entrée du virus, la réponse immunitaire développée au cours des infections herpétiques ainsi que le développement de nouvelles approches vaccinales vont permettre de faire avancer les recherches afin de mettre en place une prévention efficace contre le VHS-1.

II- Antiviraux

Plusieurs antiviraux sont approuvés pour la prophylaxie et le traitement des infections causées par le CMV et le VHS-1. Il s'agit d'inhibiteurs de l'ADN pol virale qui incluent des analogues de nucléosides et de nucléotides ainsi qu'un analogue du pyrophosphate. Un inhibiteur du complexe terminase a été récemment approuvé pour la prophylaxie des infections à CMV chez les transplantés de cellules souches hématopoïétiques.

A- Analogues de nucléosides

1) Le ganciclovir et sa pro-drogue le valganciclovir

Le ganciclovir (GCV) a été le premier antiviral approuvé pour la prévention et le traitement des infections causées par le CMV et est encore aujourd'hui le traitement de choix. Il s'agit d'un analogue de la désoxyguanosine qui nécessite une première phosphorylation par la phosphotransférase du CMV UL97 [128] (Figures 11 et 12). Le GCV-monophosphate est par la suite phosphorylé deux fois par des protéines kinases cellulaires, telles que la phosphoglycérate kinase, la guanylate kinase, la dGMP kinase et potentiellement d'autres kinases cellulaires [129-132]. Une fois tri-phosphorylé, le GCV-triphosphate entre en compétition avec les dNTP afin d'être incorporé dans l'ADN en cours d'élongation. Finalement, son incorporation va ralentir la polymérisation de l'ADN viral et peut aboutir au blocage de l'activité de l'ADN pol lors de l'ajout du dNTP suivant [133]. Bien que le GCV soit le moins toxique des antiviraux approuvés, il possède tout de même une toxicité hématologique (neutropénie, anémie et thrombocytopenie). Sa biodisponibilité orale n'est que de 6% obligeant son administration par voie intraveineuse, ce qui n'est pas avantageux. C'est pour cela que l'utilisation de sa pro-drogue, le valganciclovir (VGCV), a été approuvée en 2000. Le VGCV possède une chaîne L-valyl ester qui augmente sa biodisponibilité orale à 60% [134]. Ce groupement va être clivé par des estérases au niveau des cellules épithéliales intestinales pour sa conversion en GCV.

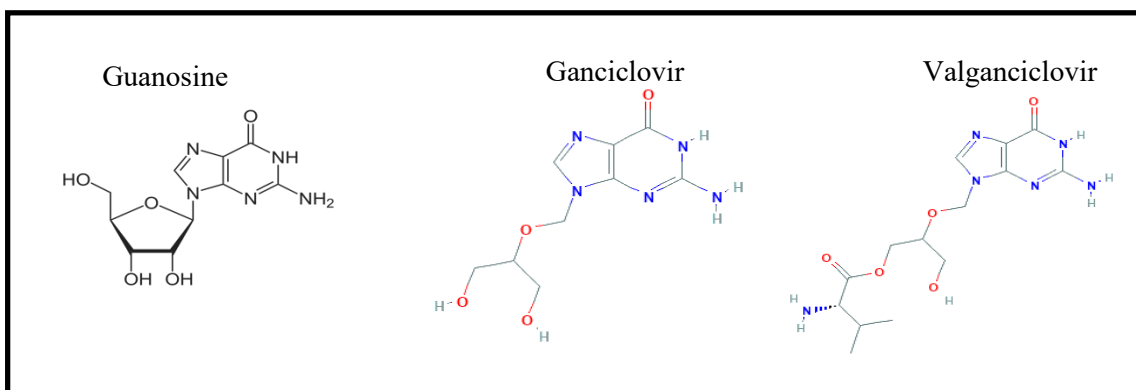


Figure 11 : Représentation de la structure de la guanosine et des analogues de la désoxyguanosine, soit le ganciclovir et le valganciclovir.

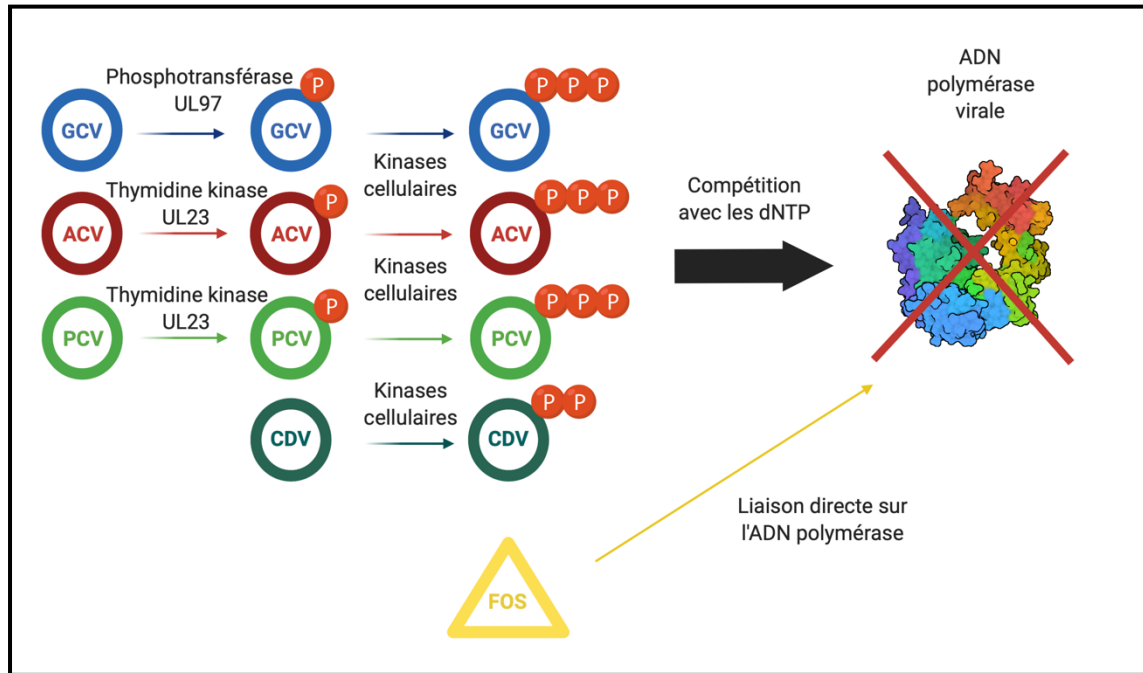


Figure 12 : Mécanismes d'action des différentes classes d'agents antiviraux.

Les analogues de nucléosides (GCV, acyclovir (ACV) et penciclovir (PCV)) sont phosphorylés par les kinases virales UL97 et UL23 du CMV et du VHS, respectivement. Par la suite, ces inhibiteurs ainsi que le cidofovir (CDV) vont être phosphorylés deux fois par les kinases cellulaires pour être actifs et entrer en compétition avec les dNTP. Le foscarnet (FOS) ne nécessite pas de phosphorylation pour être actif et se lie directement à l'ADN polymérase proche du site de liaison du pyrophosphate. Réalisé sur Biorender.com.

2) L'acyclovir, le penciclovir et leur pro-drogue

L'acyclovir (ACV) et le penciclovir (PCV) sont des analogues de la désoxyguanosine (Figure 13), les mécanismes d'activation et d'inhibition sont les mêmes que pour le GCV. Ils sont phosphorylés dans un premier temps par la thymidine kinase virale UL23 du VHS, puis vont être phosphorylés deux autres fois par des kinases cellulaires (Figure 17). Une fois sous leur forme active, ils vont pouvoir être incorporés dans l'ADN viral en cours d'élongation. L'ACV est un terminateur de chaîne; après son incorporation, il ne peut y avoir ajout de dNTP suivant car il est impossible de former une liaison 3'-5' en raison de l'absence du groupement 3'-hydroxyl [135]. Le valacyclovir (VACV), la pro-drogue de l'ACV, possède un groupement L-valyl ester qui permet d'augmenter sa biodisponibilité orale [136]. Le famciclovir (FCV) est un diacétyl ester du PCV et augmente sa biodisponibilité orale [128].

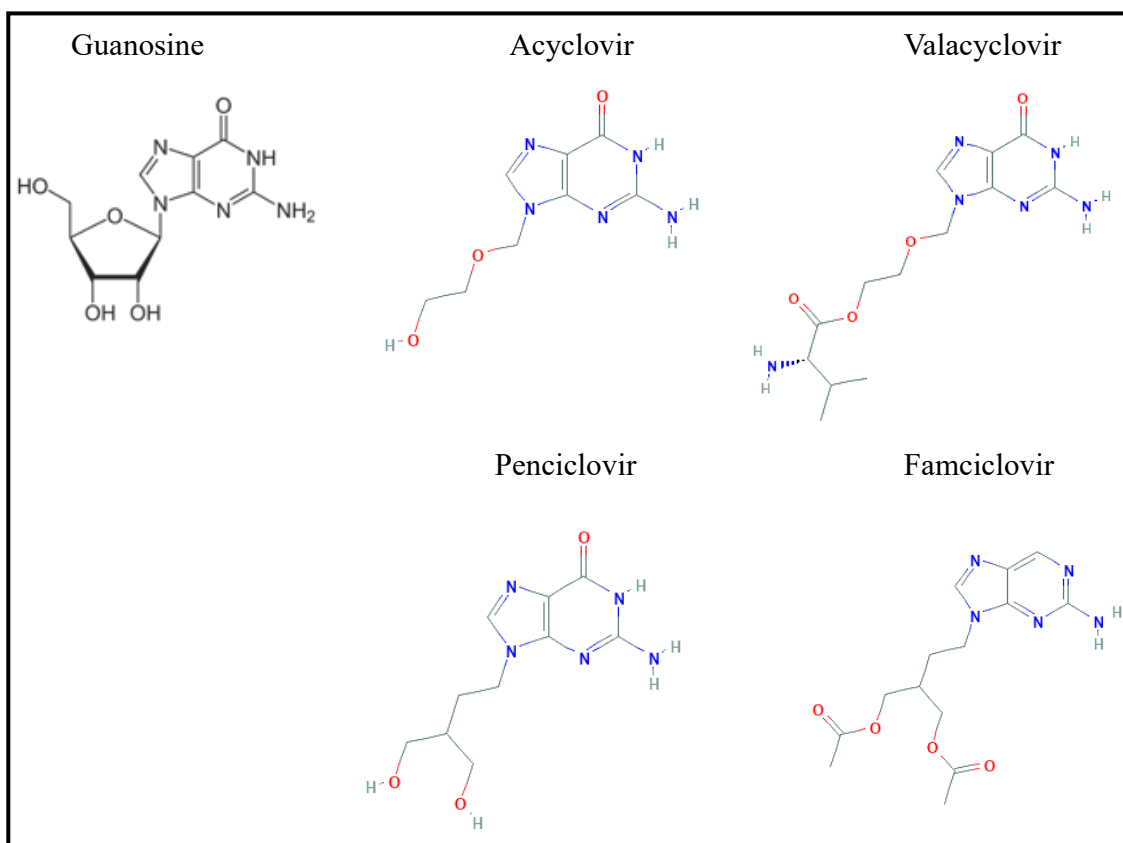


Figure 13 : Représentation de la structure de la guanosine, de l'ACV, du PCV et de leur pro-drogue respective.

B- Analogue de nucléotides

Le cidofovir (CDV), approuvé en 1996, est un analogue de nucléotide. Il possède un groupement phosphate et est donc un analogue de la désoxycytidine monophosphate. Afin d'être actif cet antiviral nécessite uniquement deux phosphorylations par des kinases cellulaires (Figure 14). Une fois di-phosphorylé, il entre en compétition avec les dNTP cellulaires pour l'incorporation dans l'ADN viral en cours d'élongation. Tout comme avec le GCV et l'ACV, la polymérisation est ralentie et l'activité de l'ADN pol sera bloquée par l'incorporation successive de deux molécules de CDV-diphosphate [137]. La durée de vie du CDV dans la cellule est très longue, ce qui est avantageux puisque le nombre d'administration est réduit à une fois par semaine [138]. Il s'agit d'un antiviral à large spectre puisqu'il est capable de cibler la majorité des virus à ADN [132]. Cependant une néphrotoxicité est associée à l'utilisation du CDV. Il est indiqué comme traitement de seconde ligne lorsque les patients infectés par le CMV ne répondent pas aux traitements de première ligne ((val)ganciclovir) ou qu'une résistance est observée.

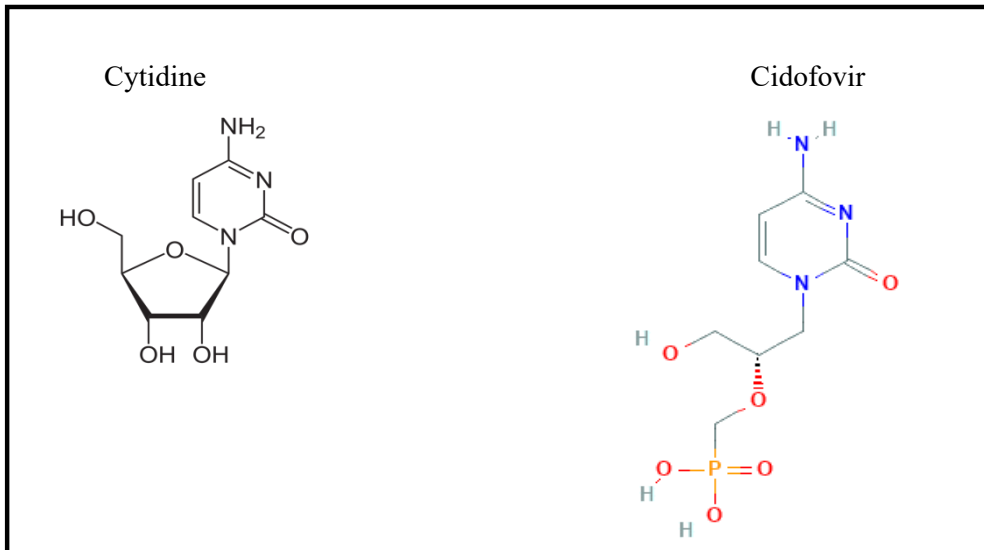


Figure 14 : Représentation de la structure de la cytidine et du cidofovir.

C-Analogue du pyrophosphate

En 1991, le foscarnet (FOS) a été approuvé pour traiter les infections à CMV. Le FOS ne nécessite pas de modification pour être sous sa forme active et va directement inhiber l'ADN pol. Il s'agit d'un inhibiteur non compétitif du pyrophosphate qui est relargué après ajout du dNTP (Figure 15). En effet, le FOS va se lier à un site proche de celui du pyrophosphate [139]. Le FOS inhibe de manière compétitive la pyrophosphorolyse (réaction inverse de la polymérisation) lors de l'ajout du dNTP mais est un inhibiteur non compétitif pour le substrat. Ainsi, une résistance au FOS n'est pas forcément associée à une résistance au pyrophosphate inorganique (PPi) ce qui suggère que les sites de liaison du FOS et du PPi ne sont pas identiques [139]. Le FOS, utilisé en traitement de seconde ligne, est également très néphrotoxique et n'est disponible que par voie intraveineuse [140]. Ainsi, le FOS est indiqué chez les patients infectés par des souches de CMV et de VHS-1 résistantes au GCV ou à l'ACV.

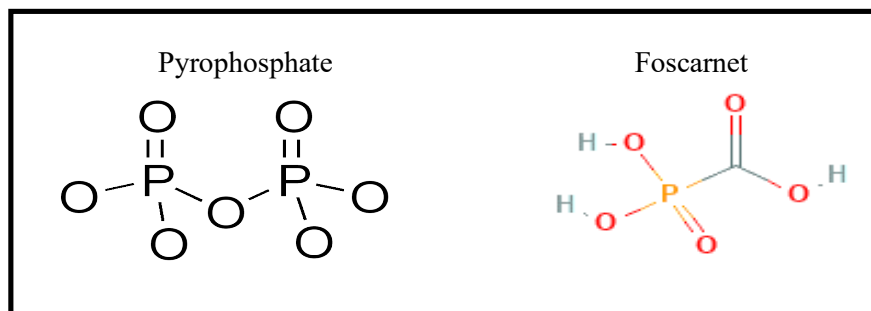


Figure 15 : Représentation de la structure du pyrophosphate et du foscarnet.

D-Inhibiteurs du complexe terminase du CMV

Il a été décrit précédemment (section encapsidation, maturation et bourgeonnement) que le complexe terminase du CMV composé des protéines UL89, UL56 et UL51 est important pour cliver les concatémères d'ADN viral et permettre leur encapsidation afin de former les nouvelles particules virales, étape indispensable du cycle viral. Il existe trois classes d'inhibiteurs du complexe terminase du CMV : les benzimidazoles ribosides, le tomeglovir et le letermovir (LTV) [132]. À ce jour, le LTV est le seul inhibiteur du complexe terminase à être approuvé au Canada pour la prophylaxie des infections à CMV chez les patients TCSH [141]. Il a été approuvé par la FDA (« *Food and Drug Administration* ») en novembre 2017. Le LTV a une action antivirale spécifique au CMV et n'inhibe pas les complexes terminase des autres virus herpétiques [142]. Il s'agit d'une 3,4 dihydroquinazoline qui inhibe la protéine virale UL56 du complexe terminase (Figure 16). Des particules virales non infectieuses peuvent être produites tandis que l'ADN viral s'accumule dans la cellule.

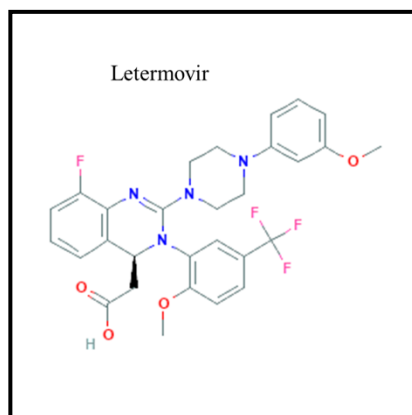


Figure 16 : Représentation de la structure du letermovir.

E- Antiviraux en développement clinique

L'ADN pol est une cible de choix pour développer des inhibiteurs contre les virus herpétiques du fait de son rôle essentiel dans la réplication virale. Cependant, il est nécessaire de développer de nouveaux antiviraux ayant d'autres cibles que l'ADN pol afin de disposer de plusieurs outils thérapeutiques et contrer l'émergence d'une résistance croisée aux antiviraux.

1) Maribavir

Le maribavir (MBV) est un L riboside benzimidazole qui inhibe l'activité de la phosphotransférase UL97 du CMV. Il s'agit d'un inhibiteur compétitif de l'ATP qui se lie à UL97 [143, 144]. La protéine virale UL97 n'est pas indispensable à la réplication virale, mais il a été montré qu'en son absence, le virus a une capacité répliquative fortement diminuée [145]. Ainsi, il s'agit d'une cible thérapeutique potentielle. Le mécanisme d'action du MBV consiste en un blocage du bourgeonnement des particules virales lors de la sortie du noyau [146]. À ce jour, seulement deux mutations associées à une résistance au MBV ont été détectées en clinique. Par contre, de nombreuses mutations conférant une résistance au MBV ont été identifiées, *in vitro*, dans le gène *UL97* ainsi que dans le gène *UL27* qui code pour la protéine UL27. Le rôle d'UL27 est peu connu mais il est suggéré que cette protéine nucléaire bloquerait le cycle cellulaire en phase G0/G1 et aurait une action antagoniste sur UL97 [147]. La résistance au MBV associée au gène *UL27* serait liée au rôle que la protéine UL97 joue dans la progression du cycle cellulaire en phase S et qui favorise la réplication virale. Ainsi, la perte de fonction d'UL27 qui permet de bloquer le cycle en G0/G1 compenserait l'inhibition d'UL97 par le MBV [148]. Cet antiviral est en étude clinique de phase III, et une étude en cours depuis septembre 2016 a pour but d'évaluer l'efficacité du MBV chez des patients transplantés qui ne répondent pas aux antiviraux (GCV, VGCV, FOS, CDV) ou qui ont développés une résistance à ceux-ci (NCT02931539).

2) Cyclopropavir

Le cyclopropavir (CPV) fait partie de la seconde génération des méthylèncyclopropanes dont la structure est proche de celle du GCV. Son action antivirale est dirigée contre la plupart des virus herpétiques dont le CMV et le VHS-1 [149]. L'implication de la protéine virale UL97 a été mise en évidence par le fait qu'un CMV recombinant déficient pour UL97 présentait une résistance au CPV [149-151]. D'autres études ont également montré qu'UL97 possédait une affinité plus élevée pour le CPV par rapport au GCV [152]. De plus, des mutations dans le gène *UL97* sont associées à une résistance au CPV ou une résistance croisée au CPV et GCV [153]. Des mutations conférant la

résistance au CPV ont également été mises en évidence dans le gène *UL54* [154], ce qui suggère que le mécanisme d'action du CPV implique à la fois *UL97* et *UL54*. Cet antiviral est en étude clinique de phase I.

3) Brincidofovir

Dans le but d'augmenter la biodisponibilité du CDV, le brincidofovir (BCV) a été développé. Il s'agit d'une molécule de CDV conjuguée à un lipide. Cet antiviral est actif contre tous les virus herpétiques et la majorité des virus à ADN [155]. Son mécanisme d'action est le même que celui du CDV. Le BCV a l'avantage d'être moins néphrotoxique que le CDV, mais possède une toxicité gastrointestinale [156]. Une formulation intraveineuse a été développée et est évaluée pour remédier à cette toxicité. La dernière étude clinique de phase III qui visait à analyser l'efficacité du BCV (voie orale) en comparaison avec le VGCV, en prévention des infections à CMV chez des patients receveurs séronégatifs (transplantés de reins), a été arrêtée (NCT02439970) [143]. À ce jour, aucune mutation n'a été détectée dans les échantillons provenant de patients participant aux essais cliniques [132, 157]. De plus, après sélection sous BCV *in vitro*, les mutations dans le gène *UL54* conféraient une résistance croisée au CDV et au GCV [132].

4) Inhibiteurs du complexe hélicase-primase

Des inhibiteurs du complexe hélicase-primase des virus herpétiques de la sous-famille α ont montré une efficacité contre le VHS et le VVZ au cours d'études cliniques. Il s'agit de l'amenamévir et du pritelivir qui ont tous les deux une action contre le complexe hélicase-primase du VVZ et du VHS, respectivement [158, 159]. De plus, l'amenamévir inhibe également le VHS-1 mais pas le VHS-2. Une étude récente a également montré un effet positif de l'association du traitement pritelivir/ACV contre l'encéphalite herpétique chez des souris [160]. L'amenamévir est actuellement approuvé au Japon pour le traitement du zona.

F- Traitements non-conventionnels

Des traitements dit non-conventionnels sont utilisés dans les cas d'infections causées par des souches multi-résistantes aux antiviraux (section Diagnostic de la résistance aux antiviraux et prise en charge des patients) ou lorsque les patients ne répondent pas aux antiviraux.

1) Cas du CMV

Les traitements non conventionnels reposent sur l'utilisation de molécules immunosuppressives. À titre d'exemple, le léflunomide (pro-drogue du tériflunomide) est utilisé pour traiter l'arthrite rhumatoïde et les rhumatismes psoriasiques [161]. Il diminue la prolifération des lymphocytes T et B et exerce une action contre le CMV en inhibant l'acquisition du tégument lors de la maturation de la capsid [162, 163]. Son effet a été observé chez des patients ayant des infections à CMV peu sévères. Cependant, certains effets secondaires ont été associés au leflunomide, tels que des troubles hépatiques et intestinaux ainsi que des conséquences liées au traitement immunosuppresseur comme des infections opportunistes [164].

Des études ont été faites sur l'utilisation d'inhibiteurs de mTOR (« *Mammalian Target Of Rapamycin* ») qui est impliqué dans la réplication du CMV. Ainsi, le sirolimus a montré un effet positif en diminuant la charge virale [165].

De plus, il a été montré que l'artésunate (ART), un agent qui a une efficacité contre le parasite *Plasmodium* responsable de la malaria, a une action anti-CMV *in vivo* et *in vitro* [166]. L'ART a également démontré un effet *in vitro* contre différents agents infectieux allant des bactéries jusqu'aux levures et en passant par différents parasites autres que celui associé à la malaria [167]. L'ART agirait au niveau des facteurs de transcription NF- κ B (« *Nuclear Factor κ B* ») et Sp1 (« *Specificity protein 1* ») [168]. L'expression des protéines virales serait ainsi perturbée et réduirait la réplication virale. L'ART a également montré un effet sur des souches de CMV résistantes à certains antiviraux [169]. Des études précédentes dans notre laboratoire ont montré un synergisme anti-CMV en combinant l'ART au GCV, au CDV ainsi qu'au MBV *in vitro* [170].

Le transfert adoptif de lymphocytes T spécifiques au CMV a été évalué dans plusieurs études mais l'avenir de cette technique dans le cadre d'infections virales n'est pas encore établi [171]. Le transfert adoptif de lymphocytes T a montré une certaine efficacité au cours d'une étude sur 32 patients présentant une infection réfractaire aux antiviraux (PCR CMV positif pendant plus de 2 semaines) après transplantation de cellules souches haplo-identiques [172].

2) Cas du VHS-1

Tout comme pour le CMV, dans le cadre d'infections à VHS-1 avec complications, l'utilisation de molécules immunosuppressives est suggérée. Ainsi, une patiente immunosupprimée

et présentant une infection causée par une souche multi-résistante de VHS-2 a été traitée avec succès à l'aide d'ART [173]. Il a également été montré, *in vivo*, sur un modèle murin d'encéphalite herpétique, que les combinaisons VACV/ART et VACV/rapamycine (inhibiteur de mTOR) avaient un effet bénéfique sur le taux de survie des souris en comparaison au traitement par le VACV seul [174].

Ces traitements non-conventionnels sont bien souvent les derniers recours en cas d'infections à CMV ou au VHS-1 associées à des souches multi-résistantes aux antiviraux ou en cas de complications. Plusieurs de ces traitements restent sujets à débat et doivent encore faire l'objet d'études afin de valider leur utilisation. C'est pour cela, qu'en parallèle, il est important de comprendre les mécanismes de résistance du CMV et du VHS-1 aux antiviraux actuels et de développer de nouveaux antiviraux agissant sur des cibles différentes de l'ADN pol.

III- Résistance aux antiviraux

L'émergence de souches présentant des mutations conférant la résistance aux antiviraux est observée suite à des prophylaxies ou des traitements de longues durées chez des patients qui ne répondent plus à l'antiviral.

A- Résistance aux antiviraux dans le cas d'infections au CMV

1) Mutations dans le gène *UL97* du CMV

La protéine UL97 est une phosphotransférase indispensable à la première étape de phosphorylation du GCV [175]. Elle peut également phosphoryler l'ACV mais est spécifique aux analogues de nucléosides puisqu'elle n'est pas impliquée dans la phosphorylation des nucléosides cellulaires [176, 177]. Des mutations dans le gène *UL97* ont été associées à la résistance du CMV au GCV. Cette protéine kinase possède un domaine catalytique contenant 11 régions conservées nommées de I à XI en fonction du pourcentage d'homologie (Figure 17) [178, 179]. La lysine en position 355 a été définie comme indispensable à l'activité catalytique de l'enzyme [180, 181]. Il est estimé que 90% des mutations associées à une résistance au GCV sont localisées dans le gène *UL97* [181]. Ces mutations consistent en des substitutions d'acides aminés ainsi que des délétions de nucléotides. Les mutations M460V/I, H520Q, C592G, A594V, L595S et C603W sont les plus

fréquemment retrouvées dans les échantillons cliniques au niveau du gène *UL97* [182]. Comme représenté à la figure 17, des mutations sont également retrouvées entre les acides aminés 590 et 607 ainsi qu’au codon 590. Le tableau 4 représente les mutations localisées dans le gène *UL97* et associées à une résistance au GCV. Des mutations ont également été identifiées en dehors des régions habituelles. Ainsi, Chou et coll. ont récemment rapporté des mutations en amont de la position 460 conférant une résistance au GCV [183]. Ces résultats suggèrent d’inclure des régions habituellement non associées à une résistance dans les futures analyses génotypiques. Pour rappel, des mutations dans le gène *UL97* ont également été associées à une résistance du CMV au maribavir (section E-Antiviraux en développement clinique). Les mutations associées au polymorphisme de l’enzyme sont concentrées dans deux régions, au début du gène (acides aminés 1-249) et à la fin du gène (acides aminés 427-674) [184]. Le mécanisme de résistance induit par ces mutations serait lié à une diminution de l’affinité de l’enzyme pour le GCV sans abolir ses autres fonctions essentielles à la réplication virale.

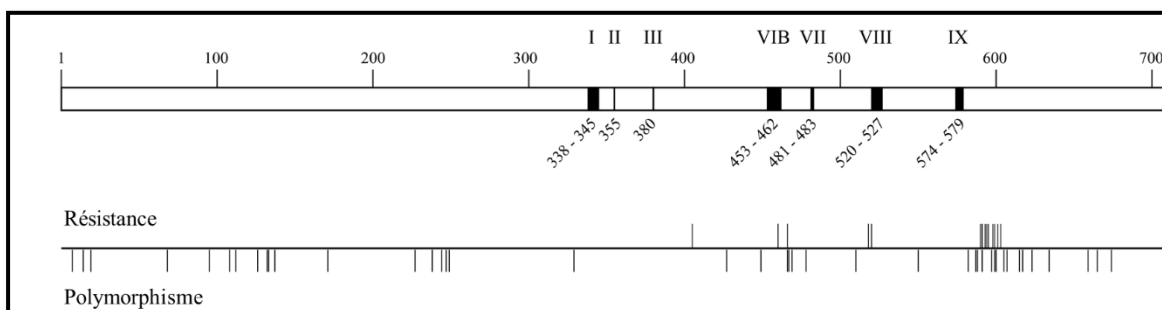


Figure 17 : Distribution des mutations localisées dans le gène *UL97* et associées à une résistance au ganciclovir ou au polymorphisme.

Les boîtes noires représentent les régions conservées (I à IX) entre les protéines kinases. Les | représentent les mutations associées à la résistance au GCV (supérieures) ou au polymorphisme (inférieures). Adapté de [178].

Tableau 4 : Liste des mutations localisées dans le gène UL97 et associées à une résistance du CMV au GCV.

Mutations	Phénotypes associés (Ratio CE ₅₀ mutant/CE ₅₀ sauvage)	Régions conservées
L405P	GCV ^R (2,5)	
M460I/L/T/V	GCV ^R (5/ND/9,3/8,3)	VI B
V466G	GCV ^R (3,5)	
C518Y	GCV ^R (12)	
H520Q	GCV ^R (10)	VIII
A591V	GCV ^R (ND)	
590-593 del	GCV ^R (ND)	
ACRA591-594 del	GCV ^R (3-10)	
591-603 del	GCV ^R (ND)	
591-607 del	GCV ^R (6)	
LENGKLTHC595-603 del	GCV ^R (8,4)	
598-603 del	GCV ^R (ND)	
599-603 del	GCV ^R (ND)	
THC601-603 del	GCV ^R (11)	
C592G	GCV ^R (2,9)	
A594G/E/P/T/V	GCV ^R (13,5/3/ND/2,7/8,3)	
L595F/S/W/del	GCV ^R (15,7/9,2/5,1/13,3)	
E596G/Y	GCV ^R (2,3/6,4)	
G598S	GCV ^R (ND)	
K599T	GCV ^R (5,3)	
600 del	GCV ^R (1,9)	
601 del	GCV ^R (ND)	
C603R/W	GCV ^R (3,6-8,3/8)	
C607Y/F	GCV ^R (12,5/ND)	
I610T	GCV ^R (2,6)	
A613V	GCV ^R (2,3)	

CE₅₀, concentration d'antiviral qui réduit de 50% le nombre d'effets cytopathiques mesurés en l'absence de drogue. ^R : résistant; ND : non déterminé. Les différentes couleurs sont associées aux régions conservées de la protéine UL97. Dépendamment des études, la résistance est définie en fonction du ratio du virus mutant par rapport au virus sauvage (>2) ou par la valeur de leur CE₅₀.

2) Mutations dans le gène UL54 du CMV

a) Résistance aux analogues de nucléosides et nucléotides

Les mutations détectées dans le gène codant pour l'ADN pol UL54 peuvent conférer une résistance du CMV au GCV et au CDV. Les mutations dans le gène *UL54* ont longtemps été associées à des traitements prolongés avec le GCV et faisant suite à des mutations pré-existantes dans le gène *UL97* [181]. Cependant, de plus en plus de mutations dans le gène *UL54* sont observées en l'absence de mutation dans le gène *UL97*. Le domaine exonucléase et la région V sont associés à des mutations

qui vont conférer des résistances croisées au GCV et au CDV (Figure 18). L'ensemble des mutations représentées à la figure 18 est repris dans le tableau 5. Différents mécanismes sont proposés concernant la résistance aux antiviraux liée à des mutations dans le gène *UL54*; i) les mutations détectées diminueraient l'affinité de l'enzyme pour les antiviraux, ii) les mutations augmenteraient l'activité exonucléase de l'enzyme, et dans ce cas, les analogues de nucléosides seraient plus facilement excisés de l'ADN en cours d'élongation, iii) l'enzyme continuerait la réaction de polymérisation malgré l'incorporation des analogues de nucléosides dans l'ADN viral [139, 185-188]. Certaines régions dans laquelle aucune mutation n'a été détectée sont fort probablement indispensables à l'activité catalytique de l'enzyme. De plus, les mutations dans le gène *UL54* sont très souvent associées à une diminution de la capacité répliquative du virus.

De nombreuses mutations associées à du polymorphisme sont observées dans le gène *UL54* et sont localisées dans des régions non conservées de l'ADN pol.

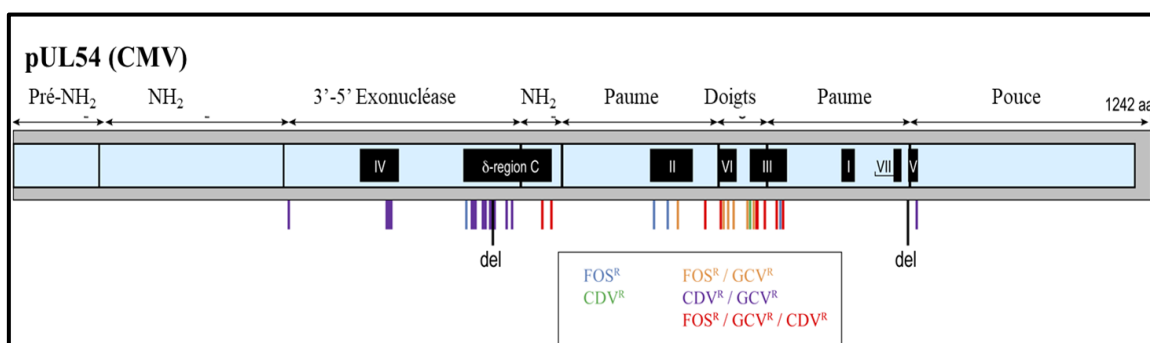


Figure 18 : Distribution des mutations conférant la résistance aux antiviraux localisées dans le gène *UL54* du CMV.

Les boîtes noires représentent les différents domaines conservés (I-VII et δ -région C) de l'ADN pol du CMV. Les domaines structuraux sont également localisés au-dessus du gène *UL54* (pré-NH₂, NH₂, 3'-5' exonucléase, paume, doigts et pouce). Les mutations conférant la résistance au GCV, au FOS ainsi qu'au CDV sont localisées au niveau du gène *UL54* du CMV. del= délétion. Provenant et adapté de [46].

Tableau 5 : Liste des mutations cliniques localisées dans le gène *UL54* et associées à une résistance du CMV aux antiviraux.

Mutations	Phénotypes associés (Ratio CE ₅₀ mutant/CE ₅₀ sauvage)			Régions conservées
	GCV	CDV	FOS	
D301N	GCV ^R (2,6)	CDV ^R (3)	FOS ^{HS} (0,5)	
N408D/K/S	GCV ^R (4,9/5,3/3,1)	CDV ^R (5,6/5,4/7,5)	FOS ^S (1,3/0,7/1,0)	Région IV
N410K	GCV ^R (2,9)	CDV ^R (3)	FOS ^S (0,8)	Région IV
F412C/L/S	GCV ^R (3,6/4,6/5,3)	CDV ^R (10/9,4/13)	FOS ^S (1,2-2,5/1,1/0,8)	Région IV
D413A/E/N	GCV ^R (6,5/4,8)	CDV ^R (10,9/4,3)	FOS ^S (0,8/0,8)	Région IV
N495K	GCV ^S (1,1)	CDV ^S (1,1)	FOS ^R (3,4)	Région δ-C
L501I/F	GCV ^R (6-20/ND)	CDV ^R (9)	FOS ^S (1,4)/ FOS ^R (ND)	Région δ-C
T503I	GCV ^R (2,9)	CDV ^R (6,1)	FOS ^{HS} (0,5)	Région δ-C
A505V	GCV ^R (1,9)	CDV ^R (1,9)	FOS ^S (1,0)	Région δ-C
K513E/N/R	GCV ^R (6/5/3,7)	CDV ^R (9,1/12,5/10,0)	FOS ^S (1,4/1,1/1,1)	Région δ-C
L516R	GCV ^R (2,1)	CDV ^R (5,1)	FOS ^S (0,8)	Région δ-C
I521T	GCV ^R (3)	CDV ^R (3,9)	FOS ^S (0,9)	Région δ-C
P522A/S	GCV ^R (3/3)	CDV ^R (4,1/3,6)	FOS ^S (1/1,1)	Région δ-C
524 del	GCV ^R (3,5)	CDV ^R (9,7)	FOS ^S (1,1)	Région δ-C
V526L	GCV ^R (5,5)	CDV ^R (2,5)	FOS ^S (1,8)	Région δ-C
C539G	GCV ^R (3,1)	CDV ^R (4,4)	FOS ^S (1,0)	Région δ-C
L545W/S	GCV ^R (4,9/3-7,4)	CDV ^R (6,3/9)	FOS ^S (1,3/1,2)	Région δ-C
Q578H/L	GCV ^R (3,3) / GCV ^S (1,9)	CDV ^R (2,3) / CDV ^S (0,8)	FOS ^R (4,5/3)	Région δ-C
D588N/E	GCV ^R (4) / GCV ^S (1,3)	CDV ^R (2,7) / CDV ^S (1,1)	FOS ^R (3,2/2,3)	Région δ-C
T700A	GCV ^S (0,9)	CDV ^S (1,5)	FOS ^R (4,7)	Région II
V715M	GCV ^S (1)	CDV ^S (1,1)	FOS ^R (5,5)	Région II
I726T/V	GCV ^R (2/1,9)	CDV ^S (1,7/1,2)	FOS ^S (1,1)/ FOS ^R (1,9)	Région II
E756D/Q/K	GCV ^S (1,2/1,7) / GCV ^R (3,5)	CDV ^S (0,7/1) / CDV ^R (2,2)	FOS ^R (3,4/4,3/>8)	
L773V	GCV ^R (3)	CDV ^R (2,5)	FOS ^R (4,4)	Région VI
L776M	GCV ^R (2,5)	CDV ^S (1)	FOS ^R (3,5)	Région VI
V781I	GCV ^R (1-4)	CDV ^S (1,2)	FOS ^R (5,2)	Région VI
V787L	GCV ^R (2-3)	CDV ^S (1)	FOS ^R (4,1)	Région VI
L802M	GCV ^R (4)	CDV ^S (1,9)	FOS ^R (10,8)	
K805Q	GCV ^S (1)	CDV ^R (2,2)	FOS ^{HS} (0,18)	Région III
A809V	GCV ^R (2,4)	CDV ^S (1,8)	FOS ^R (3,3)	Région III
V812L	GCV ^R (2,5)	CDV ^R (3,2)	FOS ^R (2,9)	Région III
T813S	GCV ^R (2,5)	CDV ^R (2,7)	FOS ^R (4,9)	Région III
T821I	GCV ^R (4,5)	CDV ^S (1,9)	FOS ^R (2,1)	Région III
A834P	GCV ^R (6,1)	CDV ^R (3)	FOS ^R (6,4)	Région III
T838A	GCV ^S (1,8)	CDV ^S (0,8)	FOS ^R (2,4)	Région III
G841A/S	GCV ^R (3,2/2,2)	CDV ^R (2,6) / CDV ^S (1,1)	FOS ^R (4,3/2,1)	Région III
981-982 del	GCV ^R (8,3)	CDV ^R (2,8)	FOS ^R (3,6)	Région V
A987G	GCV ^R (5,3)	CDV ^R (11,3)	FOS ^S (1,2)	Région V

CE₅₀, concentration d'antiviral qui réduit de 50% le nombre d'effets cytopathiques mesurés en l'absence de drogue. ^R : résistant; ^S : sensible; ^{HS} : hypersensible; ND : non déterminé. Dépendamment des études, la résistance est définie en fonction du ratio du virus mutant par rapport au virus sauvage (>1,9) ou par la valeur de leur CE₅₀, l'hypersensibilité est définie par un ratio des CE₅₀ du virus mutant par rapport à celle du virus sauvage inférieur ou égal à 0,5.

b) Résistance du CMV au FOS

Les mutations qui confèrent une résistance du CMV au FOS ne sont pas localisées au niveau d'une région spécifique, mais plutôt dans différents domaines de l'ADN pol [139]. Cependant, certaines mutations sont préférentiellement regroupées dans les régions II, III et VI de l'ADN pol du

CMV (Figure 18) [181]. Ces mutations peuvent conférer une résistance du CMV au FOS uniquement (en bleu à la figure 18), au FOS et au GCV (en orange) et à tous les antiviraux (en rouge). Ainsi, les mutations cliniques N495K, D588E, T700A, V715M, E756D/Q et T838A sont associées à une résistance au FOS uniquement alors que les mutations Q578L, I726V, L776M, V781I, V787L, L802M, A809V et G841S confèrent une résistance au FOS et au GCV. Comme mentionné précédemment, des mutations peuvent également conférer une résistance croisée à tous les antiviraux (GCV^R, CDV^R, FOS^R). C'est le cas des mutations Q578H, D588N, E756K, L773V, V812L, T813S, T821I, A834P, G841A et de la délétion 981-982. Il est intéressant de noter qu'à certaines positions dans l'ADN pol (Q578, D588 et V715), différents acides aminés vont induire des phénotypes de sensibilité aux antiviraux différents en fonction de l'acide aminé présent.

En 2017, Chou *et coll.* ont proposé que des mutations associées à la résistance du CMV au FOS pourraient être localisées dans des régions inhabituelles de l'ADN pol [189]. Ainsi, la substitution S290R obtenue *in vitro* sous pression sélective au FOS confère une résistance à cet antiviral et est localisée dans le domaine NH₂-terminal.

3) Mutations associées à une résistance du CMV au LTV

Les mutations cliniques associées à une résistance au LTV sont toutes localisées dans le gène *UL56*. À ce jour, quatre mutations cliniques ont été associées à une diminution de la sensibilité au LTV (V236M, C325F/Y/W) [190]. La protéine UL56, qui fait partie du complexe de la terminase, possède douze domaines conservés avec des protéines homologues d'autres virus herpétiques. Quelques mutations de polymorphisme dans le gène *UL56* ont été rapportées (Figure 19) [190]. D'autres mutations obtenues *in vitro* confèrent une résistance du CMV au LTV et sont localisées au niveau des gènes *UL56*, *UL89* et *UL51* qui codent pour les protéines du complexe terminase (Figure 19) [148]. Les mutations les plus fréquentes sont observées dans le gène *UL56* et n'ont pas d'impact important sur les capacités répliquatives des virus recombinants [148].

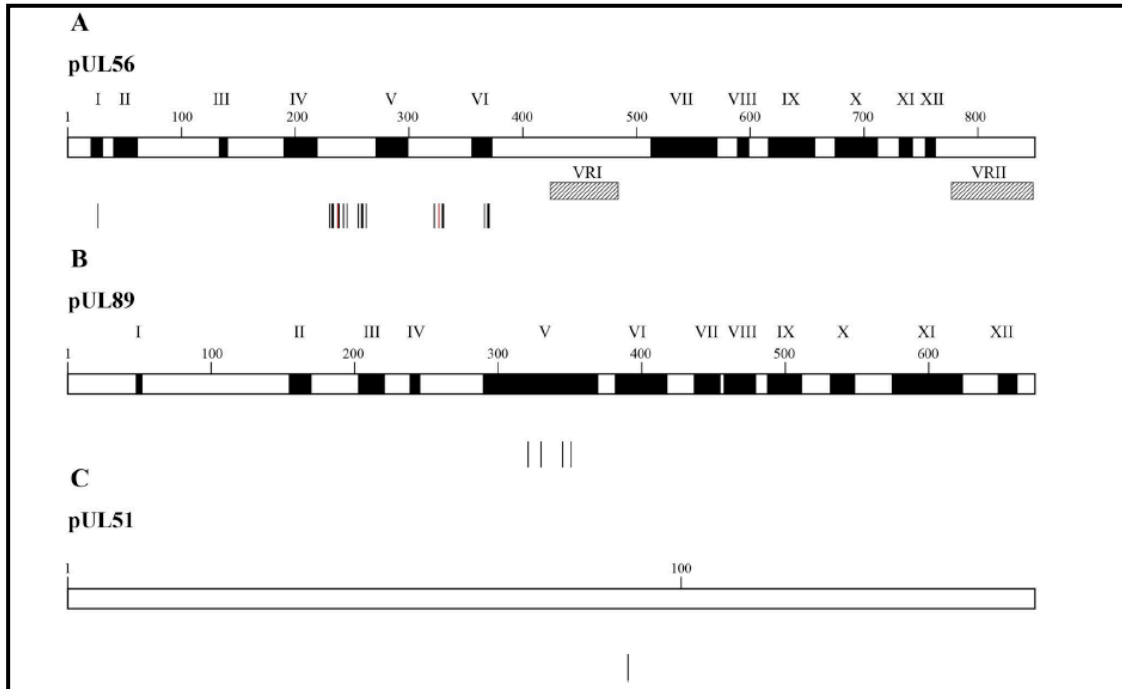


Figure 19 : Distribution des mutations conférant une résistance au letermovir dans les gènes *UL56*, *UL89* et *UL51* du CMV.

(A) Les boîtes noires représentent les différents domaines conservés I à XII de la terminase *UL56* du CMV avec d'autres terminases herpétiques, les boîtes hachurées représentent les deux régions variables VRI et VRII. (B) Les rectangles noirs représentent également les domaines conservés (I à XII) de la protéine *UL89* du CMV avec les virus herpétiques. Les | représentent les mutations associées à la résistance au LTV et localisées dans les gènes *UL56* (A), *UL89* (B) et *UL51* (C). Provenant de [148].

B- Résistance aux antiviraux dans le cas d'infections au VHS-1

Beaucoup moins de mutations cliniques conférant une résistance aux antiviraux sont rapportées dans le cas d'infection au VHS-1 comparativement au CMV.

1) Mutations dans le gène *UL23*

De même que pour le CMV, la majorité (95%) des mutations conférant une résistance du VHS-1 à l'ACV sont localisées dans le gène *UL23* qui code pour la thymidine kinase (TK) virale *UL23* du VHS-1 (Figure 20). Cette protéine est responsable de la première étape de phosphorylation de l'ACV (Figure 12). Les mutations observées peuvent être des substitutions d'acides aminés ou des

additions ou des délétions de nucléotides dans les homopolymères de C et G. Les mécanismes de résistance résulteraient d'une diminution ou d'une perte totale de l'activité d'UL23 ou d'une perte d'affinité de l'enzyme pour l'ACV. Les mutations sont principalement localisées dans les sites de liaison de l'ATP et des nucléotides ainsi qu'au niveau de l'acide aminé 336. Elles ont également été décrites dans les régions non conservées d'UL23. L'ensemble des mutations représentées à la figure 18 est repris dans le tableau 6.

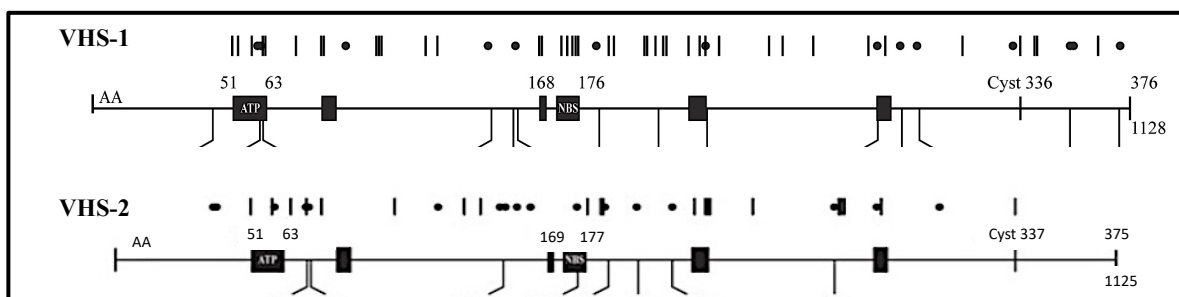


Figure 20 : Distribution des mutations conférant une résistance à l'acyclovir et localisées dans le gène *UL23* du VHS-1 et du VHS-2.

Les boîtes noires représentent les différents domaines conservés entre les thymidines kinases des virus herpétiques dont le domaine de liaison à l'ATP et le site de fixation des nucléotides (NBS). Les | représentent des substitutions d'acides aminés et les · des additions ou délétions d'acides aminés associés à une résistance à l'ACV. Provenant et adapté de [178].

Tableau 6 : Liste des mutations localisées dans le gène *UL23* et associées à une résistance du VHS-1 (A) et du VHS-2 (B) à l'ACV.

A

Mutations	Phénotypes associés (Ratio CE ₅₀ mutant/CE ₅₀ sauvage)	Région conservées
R51W	ACV ^R (984)	Site de liaison de l'ATP
Y53C/H	ACV ^R (ND)	Site de liaison de l'ATP
Y53D/stop	ACV ^R (ND)	Site de liaison de l'ATP
P57H	ACV ^R (ND)	Site de liaison de l'ATP
K62N	ACV ^R (42)	Site de liaison de l'ATP
T63A/I/S	ACV ^R (ND)	Site de liaison de l'ATP
S74stop	ACV ^R (ND)	
E83K	ACV ^R (ND)	Site 2
P84S/L	ACV ^R (ND)	Site 2
T103P/stop	ACV ^R (ND)	
Q104H/stop	ACV ^R (ND)	
H105P	ACV ^R (ND)	
M121R	ACV ^R (ND)	
Q125E/L/H	ACV ^R (ND)	
D162A/N	ACV ^R (ND)	Site 3
D162H	ACV ^R (3,5)	Site 3
R163H	ACV ^R (ND)	Site 3
L170P	ACV ^R (ND)	NBS/ Site 4
Y172C	ACV ^R (ND)	NBS/ Site 4
P173L/R	ACV ^R (ND)	NBS/ Site 4
A174P	ACV ^R (ND)	NBS/ Site 4
A175V	ACV ^R (ND)	NBS/ Site 4
R176Q/W/stop	ACV ^R (ND)	NBS/ Site 4
V187M	ACV ^R (ND)	
A189V	ACV ^R (ND)	
G200S/C/D	ACV ^R (ND)	
T201P	ACV ^R (ND)	
V204G	ACV ^R (125)	
A207P	ACV ^R (ND)	
L208F/H	ACV ^R (ND)	
R216H/C/S	ACV ^R (ND)	Site 5
R220C/H	ACV ^R (ND/147)	Site 5
R222C/H	ACV ^R (ND)	Site 5
L227F	ACV ^R (ND)	
Q250stop	ACV ^R (ND)	
T287M	ACV ^R (1050)	Site 6
L315S	ACV ^R (ND)	
C336Y	ACV ^R (30)	
L364P	ACV ^R (ND)	

B

Mutations	Phénotypes associés	Région conservées
R66P	ACV ^R	
A72S	ACV ^R	
S101S	ACV ^R	
Q105P	ACV ^R	
T131P	ACV ^R	
L158P	ACV ^R	
L177W	ACV ^R	NBS/ Site 4
S182N	ACV ^R	
M183I	ACV ^R	
G201D	ACV ^R	
R223H	ACV ^R	
V271V	ACV ^R	
P272S	ACV ^R	
D273R	ACV ^R	
T287M	ACV ^R	Site 6
C337Y	ACV ^R	

CE₅₀, concentration d'antiviral qui réduit de 50% le nombre d'effets cytopathiques mesurés en l'absence de drogue. ^R : résistant; ND : non déterminé. Dans le tableau B aucun ratio n'a été déterminé.

2) Mutations localisées dans le gène *UL30*

Bien que la majorité des mutations conférant une résistance du VHS-1 à l'ACV soient retrouvées dans le gène *UL23*, des mutations localisées dans le gène *UL30* sont également associées à une résistance à cet antiviral [178, 183]. Ces mutations sont retrouvées dans les régions conservées II (R700G, A719V, S724N), III (N815S, G841S) et VII (Y941H) de l'ADN pol. La mutation E771Q qui se situe entre les régions II et VI a également été détectée en clinique (Figure 21).

Les mutations détectées en clinique dans le cadre d'une infection au VHS-1 et associées à une résistance au FOS sont localisées au niveau de la région II d'*UL30* [178]. Ces mutations confèrent une résistance croisée au FOS et à l'ACV; la mutation S724N est associée à une résistance aux trois antiviraux (ACV^R, FOS^R, CDV^R).

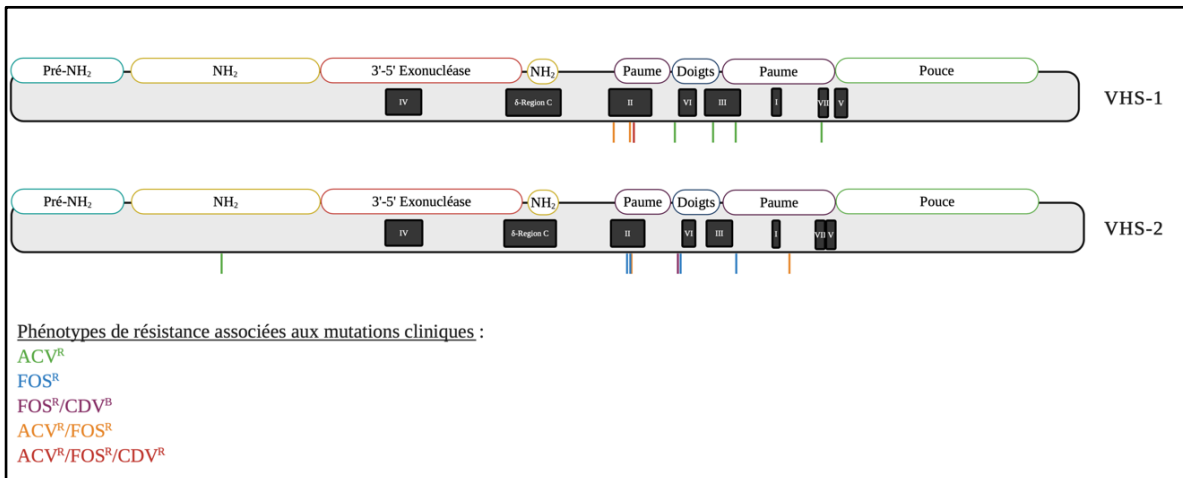


Figure 21 : Distribution des mutations cliniques conférant la résistance aux antiviraux localisées dans le gène *UL30* du VHS-1 et du VHS-2.

Les boîtes noires représentent les différents domaines conservés (I-VII et δ -région C) de l'ADN pol du VHS-1, les domaines structuraux sont également présentés au-dessus du gène *UL30* (pré-NH₂, NH₂, 3'-5' exonucléase, paume, doigts et pouce). Les mutations conférant la résistance à l'ACV, au FOS ainsi qu'au CDV sont localisées au niveau du gène *UL30* du VHS-1. Adapté de [46] et réalisé sur Biorender.com.

Tableau 7 : Liste des mutations localisées dans le gène *UL30* et associées à une résistance du VHS-1 (A) et du VHS-2 (B) aux antiviraux.

A	Mutations	Phénotypes associés (Ratio CE ₅₀ mutant/CE ₅₀ sauvage)			Régions conservées
		ACV	CDV	FOS	
	D672N	ACV ^R (ND)	CDV ^S (ND)	FOS ^R (ND)	Région II
	V715G	ACV ^R (ND)	CDV ^{HS} (ND)	FOS ^R (ND)	Région II
	A719V	ACV ^R (19)	CDV ^{S/B} (ND)	FOS ^R (ND)	Région II
	S724N	ACV ^R (9,9)	CDV ^R (2,1)	FOS ^R (2,7)	Région II
	E771Q	ACV ^R (ND)	-	FOS ^S (ND)	Entre région II et VI
	N815S	ACV ^R (59-233)	-	-	Région III
	G841S	ACV ^R (29)	-	-	Région III
	Y941H	ACV ^R (9,4)	CDV ^{HS} (0,4)	FOS ^S (1,4)	Région VII

B	Mutations	Phénotypes associés			Régions conservées
		ACV	CDV	FOS	
	E250Q	ACV ^R	CDV ^S	FOS ^S	
	A724T/V	ACV ^S /ACV ^R	CDV ^S	FOS ^R	Région II
	S725G	ACV	CDV	FOS ^R	Région II
	S729N	ACV ^B	CDV ^S	FOS ^R	Région II
	L783M	ACV ^S	CDV ^B	FOS ^R	Région VI
	D785N	ACV ^S	CDV ^{HS/S}	FOS ^R	Région VI
	L850I	ACV ^S	CDV ^{HS}	FOS ^R	Région III
	D912V	ACV ^R	CDV ^S	FOS ^R	Entre région I et VII

CE₅₀, concentration d'antiviral qui réduit de 50% le nombre d'effets cytopathiques mesurés en l'absence de drogue. ^R : résistant; ^S : sensible; ^{HS} : hypersensible; ^B : « *borderline* »; ND : non déterminé. Dépendamment des études la résistance est définie en fonction du ratio du virus mutant par rapport au virus sauvage (>1,9) ou par la valeur de leur CE₅₀, l'hypersensibilité est définie par un ratio des CE₅₀ du virus mutant par rapport à celle du virus sauvage inférieur ou égal à 0,5.

C- Répartition des mutations de résistance aux antiviraux associées aux ADN pol chez les virus herpétiques

En 2016, Topalis *et al* ont étudié la distribution des mutations qui confèrent une résistance aux différents antiviraux au niveau des ADN pol des virus herpétiques de la sous-famille α et β [191]. Deux profils distincts ont été observés, entre le VHS-1 et le CMV, dans la répartition des mutations associées à une résistance aux antiviraux. Ainsi, pour le VHS-1, les mutations sont équitablement réparties entre les différents domaines de l'ADN pol : domaine exonucléase (27,25%), de la paume (25%), des doigts (25%) et du pouce (21,5%). À l'opposé, pour le CMV, on les retrouve en majorité dans le domaine exonucléase (60,6%) puis au niveau des domaines de la paume (18,2%), des doigts (16,7%) et du pouce (4,6%). Ces résultats prennent en compte également les mutations sélectionnées

in vitro sous antiviral. Une hypothèse émise dans cette étude serait que les mécanismes de résistance seraient différents entre les virus herpétiques. Ainsi, les mutations conférant une résistance du VHS-1 aux antiviraux induiraient une diminution de l'incorporation des analogues de nucléosides alors que celles observées chez le CMV favoriseraient leur excision.

D- Diagnostic de la résistance aux antiviraux et prise en charge des patients

1) Tests phénotypes et génotypiques

Afin de déterminer si une souche CMV ou VHS-1 est résistante à un ou plusieurs antiviraux, deux principales méthodes sont utilisées, soit les tests phénotypes et génotypiques.

D'une part, les sensibilités aux antiviraux sont déterminées comme décrit précédemment. Pour cela, la méthode standard est le test de réduction de plaques que ce soit pour le CMV ou le VHS-1. En clinique, une souche CMV est définie résistante si la CE_{50} est supérieure à 6 μ M, 2 μ M et 400 μ M pour le GCV, le CDV et le FOS, respectivement [192]. Étant donné les variations inter-laboratoires, il est également possible de définir une souche comme résistante, si celle-ci a une CE_{50} augmentée de 3 fois par rapport à une souche sensible à l'antiviral en question. Concernant le VHS-1, les valeurs seuils utilisées pour définir une souche résistante sont de 9 μ M et 330 μ M pour l'ACV et le FOS, respectivement. De même que pour le CMV, une souche VHS-1 peut également être définie résistante, si le ratio de sa CE_{50} par rapport à une souche sensible à l'antiviral est supérieur à 3 [183].

D'autre part, les tests génotypiques constituent le diagnostic rapide afin de déterminer si la souche détectée est résistante à un ou plusieurs antiviraux. Ce test repose sur la recherche de la présence d'une mutation, déjà répertoriée, qui est associée à une résistance aux antiviraux. Que ce soit pour le CMV ou le VHS-1, les mutations sont recherchées dans la majorité des cas dans les gènes codant pour les ADN pol UL54/UL30 (CMV/VHS-1) mais également ceux codant pour la phosphotransférase UL97 du CMV et la thymidine kinase UL23 du VHS-1. Des banques de données se développent afin de répertorier les différentes mutations associées au phénotype de sensibilité aux antiviraux [193]. Bien entendu, les tests génotypiques impliquent que la mutation soit déjà connue dans la littérature; s'il s'agit d'une nouvelle mutation, les tests phénotypiques sont indispensables. Pour cela, la génération de virus recombinants est un outil important pour caractériser ces mutations et analyser leur sensibilité aux antiviraux.

Ainsi, l'analyse de mutations théoriques est primordiale pour augmenter le répertoire des mutations du CMV et du VHS-1 associées à une résistance aux antiviraux.

2) Prise en charge des patients infectés par le CMV

Concernant les patients TOS, une résistance au GCV est soupçonnée en l'absence de diminution de la charge virale détectée après 6 semaines de traitement avec l'antiviral [178]. Dans ce cas, il est recommandé de modifier, dans la mesure du possible, les traitements immunosuppresseurs du patient afin de lui permettre de reconstituer son immunité. D'autre part, des tests génotypiques doivent être réalisés afin d'analyser la séquence du gène *UL97*. En l'absence de mutation associée à une résistance au GCV, il est conseillé d'augmenter les doses de GCV données en intraveineuse (5-10 mg/kg deux fois par jour). L'augmentation de la dose de GCV est également recommandée si une mutation associée à un niveau faible de résistance (inférieure à 5 fois celle d'une souche sauvage) est détectée et de réaliser en parallèle le génotypage du gène *UL54*. Au contraire, si une mutation est détectée et associée à une résistance élevée au GCV (supérieure à 5 fois celle d'une souche sauvage), le remplacement du GCV par le FOS (90 mg/kg deux fois par jour) en intraveineuse est recommandé. Si aucune amélioration n'est observée au bout de 3 semaines au niveau de la charge virale et de la pathologie induite par le CMV, les gènes *UL97* et *UL54* sont séquencés. Dans ce cas, si une mutation associée à une résistance croisée au GCV et au CDV est détectée dans le gène *UL54*, le traitement par le FOS en intraveineuse est favorisé. En revanche, si une mutation conférant une résistance au FOS est identifiée, la combinaison de GCV et FOS est conseillée ainsi que l'augmentation des doses de ces antiviraux. Si aucune amélioration n'est observée et qu'une mutation conférant des résistances croisées aux antiviraux disponibles est détectée, les traitements non-conventionnels sont envisagés (section Traitements non-conventionnels).

3) Prise en charge des patients infectés par le VHS-1

Dans le cas des infections au VHS-1, une résistance à l'antiviral est soupçonnée lorsque les lésions persistent au-delà de 10 jours de traitement malgré l'administration de fortes doses d'ACV (10 mg/kg toutes les 8h), de VACV ou de FCV [178]. Un échec thérapeutique est également déclaré lorsque des lésions satellites apparaissent et lorsque des lésions déjà présentes changent d'un point de vue morphologique. Dans ce cas, un changement du traitement en faveur du FOS est recommandé (40 mg/kg toutes les 8h), et des analyses phénotypiques et génotypiques sont réalisées afin de déterminer la sensibilité de la souche aux antiviraux et d'identifier de potentielles mutations conférant une résistance. Les gènes *UL23* et *UL30* sont ainsi séquencés. Si la présence de mutations conférant

une résistance à l'ACV est observée, le traitement par le FOS est de rigueur. L'administration en continu d'ACV (1,5-2 mg/kg) est également une alternative en l'absence d'amélioration. Si le patient ne présente aucune amélioration, des traitements alternatifs sont envisagés (Section Traitements non conventionnels).

E- Caractérisation des mutations conférant une résistance aux antiviraux

De nombreuses techniques permettent d'étudier les mécanismes de résistance du CMV et du VHS-1 aux antiviraux ainsi que l'impact des mutations sur l'activité des ADN pol et leur inhibition par les antiviraux. Dans cette section, seules les techniques utilisées dans les projets de ma thèse et qui feront l'objet des prochains chapitres seront détaillées.

1) Virus recombinants

a) Génération des virus recombinants CMV

Afin d'introduire les mutations désirées dans le gène *UL54*, nous utilisons un système de recombinaison homologe basé sur la mutagenèse « en passant » [194]. Cette technique repose sur l'utilisation d'un chromosome bactérien artificiel (BAC) qui contient le génome de la souche AD169 ainsi que le gène rapporteur de la Gaussia Luciférase (G-Luc) dans le but de déterminer le niveau de réplication du génome viral (Figure 22) [194]. Cette technique a l'avantage de pouvoir introduire des mutations n'importe où dans le génome du CMV sans insérer de séquences cicatrices. De plus, il est également possible d'introduire plusieurs mutations dans différents gènes. Nous utilisons les bactéries *E. Coli* GS1783 qui ont été modifiées génétiquement afin d'exprimer les protéines de recombinaison (Exo, Beta et Gam qui sont inductibles à la chaleur) ainsi que l'enzyme de restriction I-SceI (inductible par l'arabinose) dont le site de reconnaissance est large (18 paires de bases) et très spécifique. La première étape consiste à introduire dans le génome du CMV une construction universelle de transfert qui contient une cassette de résistance à la kanamycine entourée d'une séquence homologue de 40 paires de bases incluant la mutation désirée ainsi que le site de clivage de l'enzyme I-SceI. Suite à l'induction de l'expression de l'endonucléase I-SceI, la cassette de résistance à la kanamycine est éliminée. Par la suite, des cellules MRC-5 sont transfectées avec le BAC pour reconstituer le virus recombinant. Les sensibilités aux antiviraux ainsi que les capacités répliquatives sont déterminées par mesure de l'activité de la G-Luc.

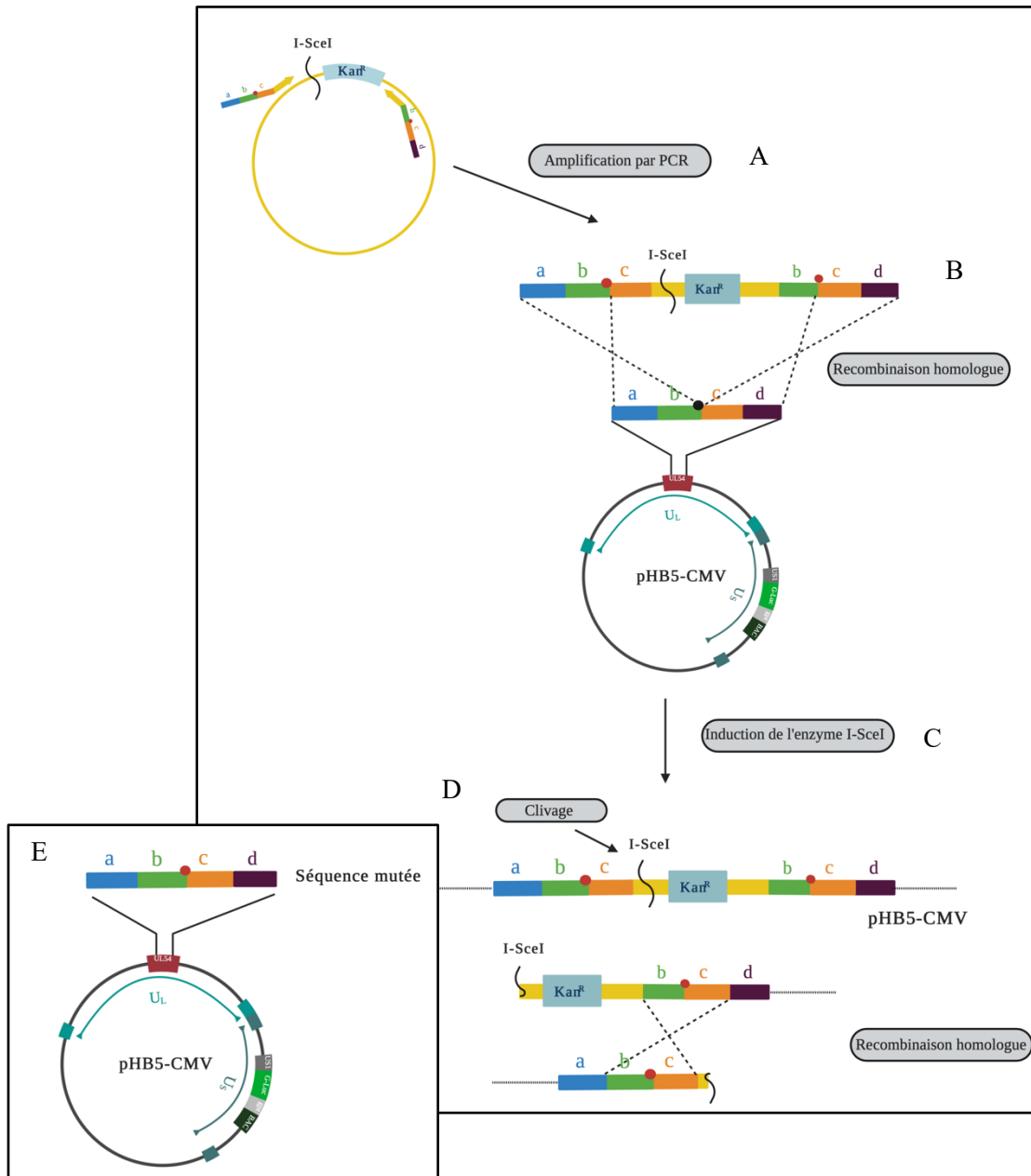


Figure 22 : Schéma représentant les étapes permettant d'introduire une mutation dans un gène du CMV par mutagenèse en passant.

A) Amplification de la cassette de résistance à la kanamycine et du site de restriction de l'enzyme I-SceI par PCR. Pour cela, des amorces contenant la mutation désirée (●) et des séquences d'homologies à la séquence cible sont utilisées (a-b-c-d). (B) Recombinaison homologue induite par la chaleur. (C) Induction de l'enzyme I-SceI par l'arabinose. (D) Clivage de l'enzyme I-SceI, recombinaison intragénique entre les séquences dupliquées. (E) Séquence finale du gène avec introduction de la mutation désirée. Adapté de [194] et réalisé sur Biorender.com.

b) Génération des virus recombinants VHS-1

Pour les virus recombinants VHS-1, nous utilisons également un système de recombinaison homologue basé sur l'utilisation de cosmides et de plasmides chevauchants qui permet de reconstituer le génome viral [195]. En effet, le génome du VHS-1 a été divisé en une série de cosmides (Cos 32, Cos 24, Cos 71, Cos 48, Cos 51). Le cosmide 71 a été divisé en trois plasmides (pNEB23, pNEB10 et pPOL6) (Figure 23). Le gène codant pour l'ADN pol UL30 a été cloné dans le plasmide pPOL6 et les mutations désirées sont introduites dans ce plasmide par mutagenèse dirigée. Des cellules VERO sont ensuite transfectées avec ces cosmides et plasmides, et le génome du VHS-1 est reconstitué par des événements de recombinaisons homologues.

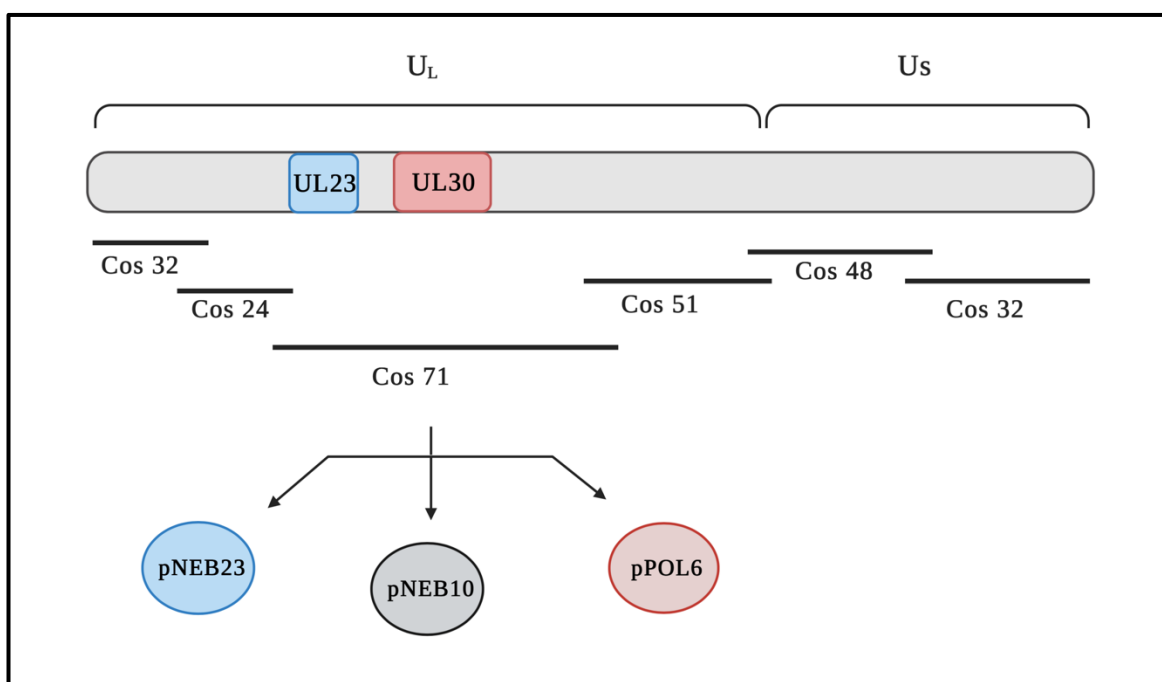


Figure 23 : Schéma représentant le système de cosmides et plasmides utilisé pour reconstituer le génome du VHS-1.

Le génome viral a été cloné en une série de cosmides (Cos 32, Cos 24, Cos 71, Cos 51 et Cos 48) et le Cos 71 a lui-même été divisé en trois plasmides (pNEB23, pNEB10 et pPOL6). Le plasmide pPOL6 contient le gène *UL30* et c'est dans ce plasmide que les mutations sont introduites par mutagenèse dirigée [195]. Réalisé sur Biorender.com.

La sensibilité des virus recombinants aux antiviraux est analysée par des tests de réduction de plaques (PRA) [196]. Les capacités répliquatives sont mesurées par RTCA (« *Real Time Cell Analysis* »). L'analyse du nombre et de la morphologie des cellules en temps réel repose sur

l'utilisation de plaques 96 puits dont le fond contient des senseurs microélectroniques qui mesurent l'impédance des cellules toutes les 30 minutes. Les différences d'impédance induites par les changements de morphologie ou du taux de croissance des cellules sont représentées par un paramètre appelé index cellulaire qui permet de comparer les capacités répliquatives de différents virus recombinants [197].

2) Activités des ADN pol et inhibition par le FOS

Les mutations sont introduites par mutagenèse dirigée dans les gènes codant pour les ADN pol (UL54/UL30) qui sont clonés dans un plasmide. Les protéines sont exprimées *in vitro* par un système de transcription-traduction dans des lysats de réticulocytes de lapin [188]. Ce système permet d'exprimer les protéines mais également d'apporter les modifications post-traductionnelles qui lui sont nécessaires. Une fois exprimées, les activités de polymérisation des protéines recombinantes sauvages et mutées et leur inhibition par le FOS peuvent être analysées par FBA (« *Filter-Based Assay* »). L'ADN de thymus de veau activé sert de matrice à l'ADN pol. Lors des essais enzymatiques, un dNTP parmi les quatre utilisés est radioactif ($[H^3]$) et permet de déterminer l'activité polymérase. Le mélange réactionnel est déposé sur un filtre et la radioactivité associée au filtre est mesurée par comptage en scintillation liquide. Ces tests enzymatiques permettent de déterminer les paramètres cinétiques des ADN polymérases (V_{max} , K_m) et les paramètres d'inhibition par les antiviraux (CI_{50} , K_i).

3) Modèle d'études des ADN pol et modélisations

a) *gp43, ADN pol modèle de la famille B*

Parmi les ADN pol de la famille B, celle du bactériophage RB69 (gp43) est le modèle d'étude privilégié, puisqu'elle a été cristallisée sous différentes conformation : l'apoenzyme (l'ADN pol seule), le complexe binaire après fixation de l'ADN et le complexe ternaire (enzyme-ADN-dNTP entrant) [198-200]. Des études d'homologie structurale ont permis d'établir que les ADN pol des virus herpétiques ont comme l'enzyme gp43 une structure associée à la forme d'une main droite contenant le domaine de la paume, des doigts et du pouce (Figure 24).

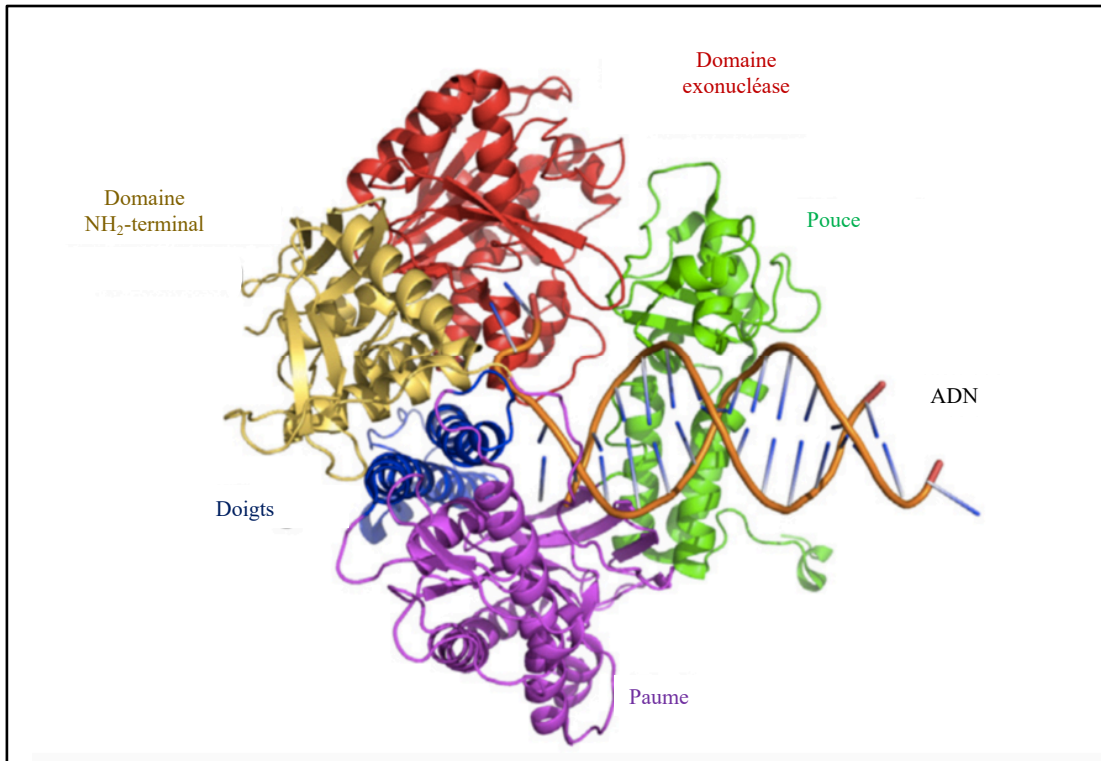


Figure 24 : Représentation de l'ADN pol gp43 du bactériophage RB69 en mode réplication.

Cette représentation de l'ADN pol du bactériophage RB69 en mode réplication montre les différents domaines : en jaune, le domaine NH₂-terminal, en rouge, le domaine exonucléase, en vert, le pouce, en violet, la paume et en bleu, le domaine des doigts. Adapté et provenant de [32].

Avant 2006, les recherches basées sur l'ADN pol gp43 de RB69 ont permis de faire avancer les connaissances concernant le fonctionnement des ADN pol de cette famille. La réplication de l'ADN viral permet de générer plusieurs copies du génome viral qui vont servir à constituer les nouvelles particules virales. Les ADN pol des virus herpétiques possèdent une activité de polymérisation de 5' vers 3'. Au cours de la polymérisation, l'ADN pol subit différents changements de conformation qui ont pu être étudiés sur le modèle de l'ADN pol gp43 du bactériophage RB69. Ainsi, après liaison du duplex ADN à l'apoenzyme, le domaine du pouce encercle l'ADN, le domaine des doigts (hélices N et P) se déplace vers le domaine NH₂-terminal et l'enzyme est dans sa conformation ouverte (Figure 25). Lors de la liaison du dNTP+1, le domaine des doigts se rapproche du domaine catalytique (domaine de la paume). Ce mouvement des doigts confère à l'ADN pol sa conformation fermée, ce qui permet le transfert du nucléotide en 3'OH, puis le relargage du

pyrophosphate et la translocation de l'ADN. L'enzyme est de nouveau dans sa conformation ouverte et un nouveau dNTP est incorporé dans l'ADN en cours d'élongation.

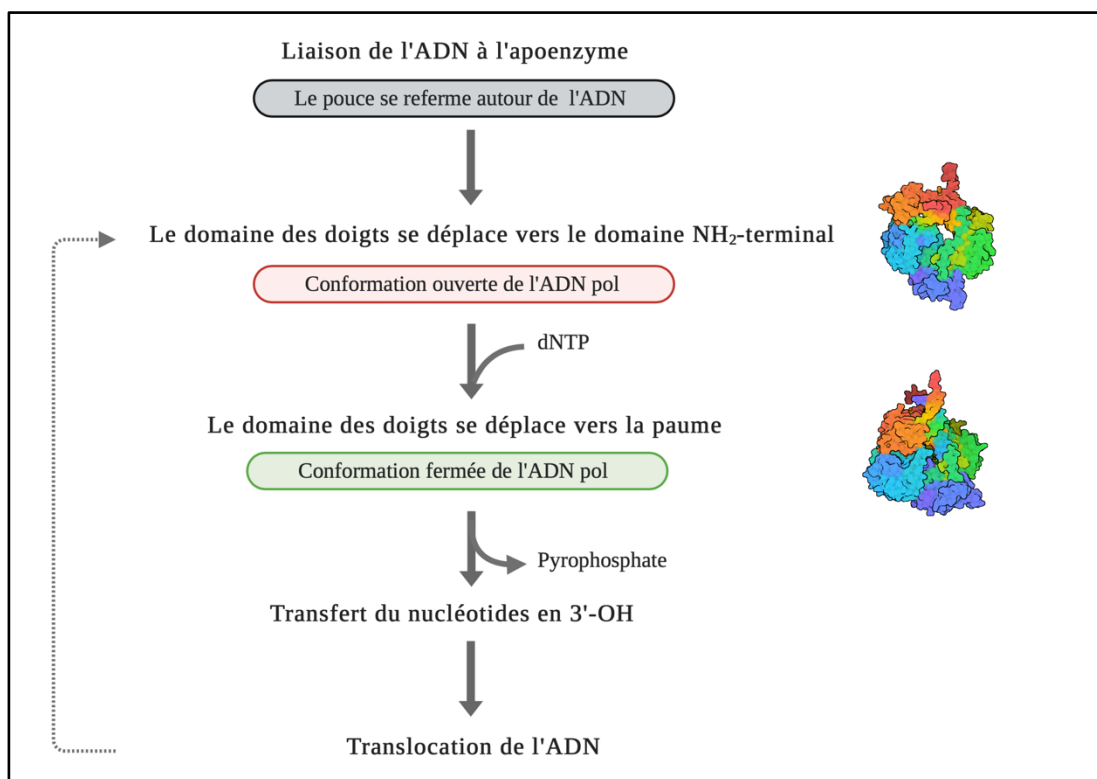


Figure 25 : Représentation du mécanisme de polymérisation des ADN polymérases du CMV et du VHS-1.

Schéma représentant les mouvements des différents domaines mis en place lors de la polymérisation. À droite, les structures de l'ADN pol du bactériophage RB69 (PDB 1CLQ et 3LDS) sont utilisées comme modèle pour représenter les ADN pol dans leurs conformations ouverte et fermée. Adapté de [46] et réalisé sur Biorender.com.

De nos jours, cette enzyme sert encore de modèle pour comprendre les mécanismes impliqués dans la polymérisation de l'ADN. De plus, les ADN pol des bactériophages T4 et RB69 sont naturellement résistantes au FOS, alors que celles des virus herpétiques sont sensibles à l'antiviral. Götte et coll. ont généré une enzyme chimérique en remplaçant des régions des hélices N et P de l'ADN pol de RB69 par les régions équivalentes retrouvées dans l'ADN pol UL54 du CMV [201]. Les enzymes chimériques avaient une sensibilité au FOS augmentée par rapport à l'enzyme sauvage, en particulier celle possédant la mutation V478W (hélice N). L'enzyme chimérique est facilement exprimée en bactéries et a également été cristallisée en présence de FOS, ce qui a permis de mieux

comprendre le mécanisme d'action de l'antiviral et de mettre en évidence le fait que le FOS se lierait à l'ADN pol dans sa conformation fermée [188].

b) UL54, des modèles d'homologie en l'absence de cristallisation

L'ADN pol UL54 du CMV n'étant pas encore cristallisée à ce jour, l'utilisation de modèles d'homologie est un outil important pour comprendre les mécanismes de résistance aux antiviraux. En 2006, notre groupe a généré un modèle 3D de la protéine UL54 et l'a utilisé pour tenter de comprendre les mécanismes de résistance du CMV au GCV/CDV et au FOS. Pour cela, des modèles déjà connus des bactériophages ont été utilisés et ont permis par homologie de structure d'obtenir des modèles 3D de la protéine dans sa conformation ouverte et également dans sa conformation fermée (Figure 26) [202]. À cette époque, il n'était pas possible de faire des modélisations au-delà de 1000 résidus et seules les régions impliquées dans le mécanisme d'action aux antiviraux (acides aminés 281-1092) ont été utilisées. UL54 est l'ADN pol ayant la taille la plus importante parmi les virus herpétiques. Il s'agit également d'une protéine très complexe, et de ce fait, difficile à produire en grande quantité, ce qui explique qu'elle ne soit pas encore cristallisée. Cependant, la modélisation 3D est un excellent moyen d'étudier l'impact des mutations sur la conformation de la protéine et d'expliquer les mécanismes de résistance aux antiviraux.

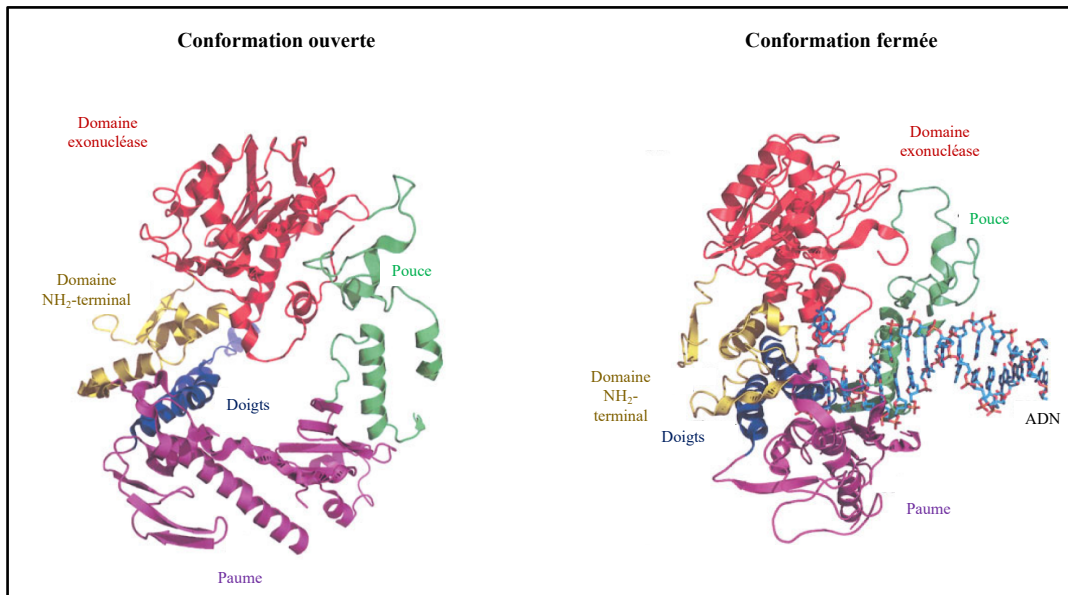


Figure 26 : Modélisation 3D de l'ADN pol UL54 dans sa conformation ouverte et fermée. Représentation d'UL54 dans sa conformation ouverte et fermée montrant les différents domaines : en jaune, le domaine NH₂-terminal, en rouge, le domaine exonucléase, en vert, le pouce, en violet, la paume et en bleu, le domaine des doigts. Provenant et adapté de [202].

c) UL30, un modèle d'étude pour les virus herpétiques

En 2006, la cristallisation de l'ADN pol du VHS-1 a constitué une étape importante pour la compréhension du fonctionnement de l'enzyme, la confirmation des hypothèses émises concernant sa structure mais également pour la compréhension des mécanismes de résistance non seulement pour le VHS-1, mais également pour le CMV [203]. La cristallisation d'UL30 a permis de mettre en avant la présence d'un domaine pré NH₂-terminal qui serait commun à toutes les ADN pol des virus herpétiques (Figure 27). Cette avancée permet d'affiner les modélisations 3D et d'approfondir les recherches fondamentales concernant les ADN pol des virus herpétiques ainsi que leurs sensibilités aux antiviraux.

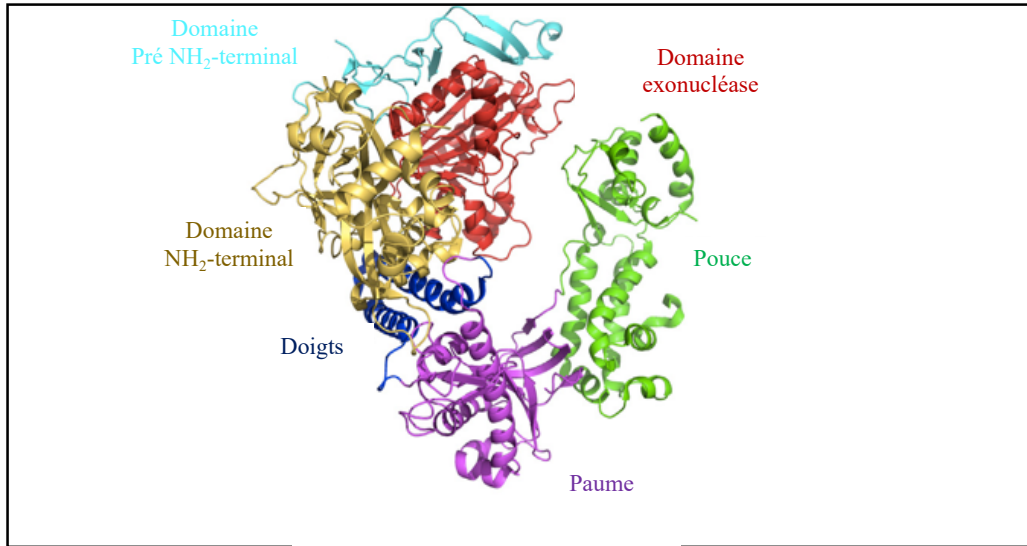


Figure 27 : Structure de l'ADN pol UL30 du VHS-1 dans sa conformation ouverte.
Représentation d'UL30 dans sa conformation ouverte qui montre les différents domaines : en bleu cyan, le domaine pré NH₂-terminal, en jaune, le domaine NH₂-terminal, en rouge, le domaine exonucléase, en vert, le pouce, en violet, la paume et en bleu, le domaine des doigts. Adapté et provenant de [32].

Chapitre 1 : Hypothèse & Objectifs de la thèse

1.1 Hypothèse

Les ADN pol UL54 et UL30 sont composées de six domaines conservés appelés pré-NH₂-terminal, NH₂-terminal, exonucléase, doigts, paume et pouce. Ces enzymes adoptent des changements de conformation au cours de la réaction de polymérisation. Suite à la liaison de l'ADN à l'enzyme, le domaine du pouce se referme autour de l'ADN, le domaine des doigts se déplace vers le domaine NH₂-terminal et l'enzyme est alors dans sa conformation ouverte. Lors de la liaison du dNTP suivant, le domaine des doigts se déplace vers celui de la paume et l'enzyme est dans sa conformation fermée. L'antiviral foscarnet inhibe l'activité de l'ADN pol en se liant directement à l'enzyme sans nécessité d'une activation préalable. Il a déjà été montré que des mutations conférant une résistance au FOS et localisées dans les hélices N et P (domaine des doigts) favorisaient une conformation plus ouverte de l'ADN pol à laquelle le FOS se lie avec moins d'affinité [187, 188].

Mon projet de thèse avait pour hypothèse que des mutations localisées dans l'hélice K du domaine NH₂-terminal et dans la région II du domaine de la paume qui participent indirectement aux changements de conformation de l'enzyme favoriseraient aussi une conformation plus ouverte de l'ADN pol du CMV et du VHS-1, et par conséquent, impacterait leur niveau de sensibilité au FOS ainsi que la capacité répliquative des virus recombinants mutants.

1.2 Objectifs

1) Étude des mécanismes de résistance du CMV et du VHS-1 au FOS

Le premier objectif a été de générer des virus recombinants CMV et VHS-1 possédant des substitutions théoriques localisées dans les régions impliquées dans les changements de conformation de l'ADN pol, soit l'hélice K (domaine NH₂-terminal) et la région II (domaine de la paume). Ces mutations théoriques ont été sélectionnées sur base de l'alignement des séquences en acides aminés des ADN pol des bactériophages RB69 et T4 qui sont naturellement résistantes au FOS et celles des ADN pol des virus herpétiques qui y sont sensibles (Figure 28).

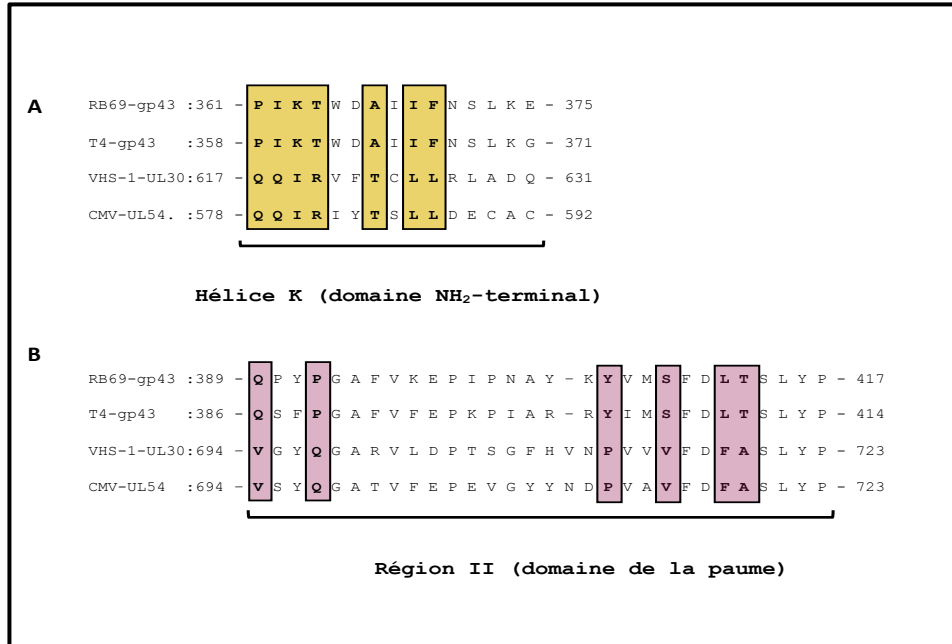


Figure 28 : Alignements de séquences de l'hélice K du domaine NH₂-terminal (A) et de la région II de la paume (B) des ADN pol des bactériophages T4 et RB69, du CMV et du VHS-1. En gras sont indiquées les substitutions qui ont été sélectionnées.

Une fois les virus recombinants mutants générés, nous avons déterminé leur sensibilité aux antiviraux et nous avons sélectionné ceux présentant une sensibilité diminuée (résistants) ou augmentée (hypersensibles) au FOS pour étudier les mécanismes de résistance.

2) Étude des mécanismes d'hypersensibilité du CMV au FOS

Parmi les substitutions théoriques sélectionnées, la substitution Q579I localisée dans l'hélice K de l'ADN pol UL54 conférait une hypersensibilité du CMV au FOS. Le deuxième objectif de ce projet consistait à étudier les mécanismes impliqués dans l'hypersensibilité (phénotype inverse de la résistance) au FOS en comparant la substitution Q579I à la substitution K805Q déjà connue pour être associée à une hypersensibilité du CMV au FOS [204].

3) Effet différentiel de substitutions au codon 715 des ADN pol du CMV et du VHS-1

La substitution théorique V715S localisée dans la région II de l'ADN pol conférerait une résistance au FOS et au GCV pour le CMV et au FOS ainsi qu'à l'ACV pour le VHS-1. Dans la littérature, différents profils de sensibilité aux antiviraux ont été rapportés pour plusieurs substitutions au codon V715, telles que la V715G du VHS-1 (FOS^R/ACV^R) et la V715M du CMV et du VHS-1 (FOS^R/GCV^R et FOS^S/ACV^R, respectivement) [195, 205, 206]. Ces résultats suggèrent que ce codon pourrait jouer un rôle clé dans la résistance des virus herpétiques aux antiviraux. Le troisième objectif de ce projet consistait à comparer des CMV et des VHS-1 recombinants possédant les substitutions V715G/M/S dans leurs ADN pol.

Pour chacun de ces objectifs, nous avons utilisé le même schéma expérimental. Nous avons d'abord déterminé les sensibilités au FOS et au GCV (CMV) ou à l'ACV (VHS-1) ainsi que les capacités répliquatives pour chaque virus recombinant mutant. Nous avons ensuite produit des ADN pol recombinantes mutantes pour déterminer leur activité enzymatique ainsi que leur inhibition par le FOS. Finalement, nous avons généré des modèles tridimensionnels d'UL54 et d'UL30 dans leurs conformations ouverte et fermée et nous avons analysé l'impact des différentes substitutions sur la structure et la conformation des protéines.

Chapitre 2 : Résistance du cytomégalovirus humain et du virus herpès simplex 1 au foscarnet induite par des mutations dans l'hélice K et la région II des ADN polymérases virales

2.1 Résumé

L'étude présentée dans ce chapitre avait pour objectif de mieux comprendre les mécanismes de résistance du CMV et du VHS-1 au FOS. Une série de virus recombinants mutants a pu être générée. Seules les substitutions I619K (hélice K; VHS-1), Q697P (région II, CMV), V715S et A719T (région II; CMV et VHS-1) conféraient une résistance au FOS, alors que la substitution Q579I (hélice K; CMV) était associée à une hypersensibilité au FOS. Ces profils de susceptibilité aux antiviraux ont été confirmés par des tests d'inhibition de l'activité des ADN pol mutées par le FOS. Une diminution des capacités répliquatives des virus recombinants possédant ces mutations par rapport à celle du virus sauvage a également été observée. Les analyses tri-dimensionnelles des protéines mutées suggéraient que la résistance au FOS seraient associées à une déstabilisation de la conformation fermée des ADN pol favorisant une conformation plus ouverte pour laquelle l'antiviral a une plus faible affinité.

2.2 Abstract

The study presented in the chapter aimed at better understanding the mechanism of resistance of CMV and HSV-1 to FOS. We report theoretical mutations associated to resistance and hypersusceptibility to FOS. Thus, substitutions I619K (in helix K; HSV-1), Q697P (region II, CMV), V715S and A719T (region II; CMV and HSV-1) conferred resistance to FOS whereas the substitution Q579I (helix K; CMV) was associated to a hypersusceptibility phenotype. These drug susceptibility profiles were confirmed by enzymatic inhibition assays of the recombinant mutant DNA pol by FOS. By three-dimensional modeling, we analyzed the impact of these mutations on the structure of the viral DNA pol of both viruses. Mutations conferring resistance of both viruses to FOS were associated to a destabilization of the closed conformation of the protein for which FOS has a higher affinity compared to the open one.

2.3 Article

Title Page

Impact of Amino Acid Substitutions in Region II and Helix K of HSV-1 and HCMV DNA Polymerases on Resistance to Foscarnet

Running Title: HSV-1 and HCMV resistance to foscarnet

Karima Zarrouk¹, Xiaojun Zhu², Van Dung Pham², Nathalie Goyette¹, Jocelyne Piret¹, Rong Shi^{2,3}
and Guy Boivin^{1,#}

¹, Research center in infectious diseases, CHU de Québec- Laval University, Quebec City, QC, Canada. ², PROTEO, and Institute of Integrative and Systems Biology, ³ Department of Biochemistry, Microbiology and Bioinformatics, Laval University, Quebec City, QC, Canada

Abstract word count: 250

Text word count: 6 246

Figures: 6

Tables: 3

#, Correspondent footnote:

Dr Guy Boivin

E-mail: Guy.Boivin@crchudequebec.ulaval.ca

ABSTRACT

Amino acid substitutions conferring resistance of herpes simplex virus 1 (HSV-1) and human cytomegalovirus (HCMV) to foscarnet (PFA) are respectively located in *UL30* and *UL54* genes encoding the DNA polymerase (pol). In this study, we analyzed the impact of substitutions located in helix K and region II that are involved in the conformational changes of the DNA pol. Theoretical substitutions were identified by sequences alignment of the helix K and region II of human herpesviruses (susceptible to PFA) and bacteriophages (resistant to PFA) and introduced in viral genomes by recombinant phenotyping. We characterized the susceptibility of HSV-1 and HCMV mutants to PFA. In *UL30*, substitutions I619K (helix K), V715S and A719T (both in region II) increased mean PFA EC₅₀ by 2.5-, 5.6- and 2.0-fold compared to wild type (WT), respectively. In *UL54*, substitution Q579I (helix K) conferred hypersusceptibility to PFA (0.17-fold change) whereas substitutions Q697P, V715S and A719T (all in region II) increased mean PFA EC₅₀ values by 3.8-, 2.8- and 2.5-fold compared to WT, respectively. These results were confirmed by enzymatic assays using recombinant DNA pol harboring these substitutions. Three-dimensional modeling suggests that substitutions conferring resistance/hypersusceptibility to PFA located in helix K and region II of *UL30* and *UL54* DNA pol favor an open/closed conformation of these enzymes resulting in a lower/higher drug affinity for the proteins. Thus, this study shows that both regions of *UL30* and *UL54* DNA pol are involved in the conformational changes of these proteins and can influence the susceptibility of both viruses to PFA.

Keywords: HSV-1, HCMV, DNA polymerase, foscarnet, resistance, 3D-modeling, palm domain, NH₂-terminal domain

Introduction

Most antiviral agents currently approved for the prophylaxis and treatment of herpes simplex virus (HSV) and human cytomegalovirus (HCMV) infections target the viral DNA polymerase (pol), an enzyme essential for the viral replication that is encoded by the *UL30* and *UL54* genes, respectively. First-line drugs for HSV infections consist in the nucleoside analogues acyclovir (ACV), its prodrug valacyclovir and famciclovir (the prodrug of penciclovir) (1). First-line treatment of HCMV infections is based on the use of ganciclovir (GCV), a deoxyguanosine analogue, and its prodrug valganciclovir (2). These nucleoside analogues require a first phosphorylation by a viral kinase followed by two subsequent phosphorylations by cellular kinases. The triphosphorylated forms are then incorporated into replicating DNA and ultimately stop chain elongation. However, clinical failure that may be associated with drug resistance could arise in immunocompromised patients who received nucleoside analogues for long periods of time. Second-line treatments consist of the cytosine analogue, cidofovir (CDV), and the pyrophosphate analogue, foscarnet (PFA) (1). CDV needs to be phosphorylated only twice by cellular kinases to be active. CDV-diphosphate competes with deoxycytidine triphosphate for incorporation in elongating DNA and slows down the viral DNA pol activity. Two successive incorporations of CDV-diphosphate are needed to stop the polymerization reaction (3). PFA does not require to be phosphorylated; it directly binds to the viral DNA pol and prevents the release of pyrophosphate following transfer of the nucleotide to the elongating DNA. However, the emergence of HSV and HCMV isolates with amino acid substitutions in the viral DNA pol conferring resistance to one, two or even all antiviral agents has been reported (4, 5). Recently, letermovir, an inhibitor of the HCMV terminase complex, has been approved for the prophylaxis of HCMV-seropositive adult recipients of hematopoietic stem cell transplant (6).

The DNA pol of herpesviruses belong to the family B DNA pol which also includes the gp43 DNA pol of RB69 and T4 bacteriophages (7). The gp43 DNA pol of RB69 has been crystalized in the different conformations adopted by the enzyme during the DNA polymerization process (8-10). The structure of the DNA pol has been likened to a right hand that contained different domains, i.e., the palm, thumb, fingers, exonuclease and NH₂-terminal domains (11, 12). In addition, the DNA pol of herpesviruses possesses a pre-NH₂ terminal domain (13). The DNA polymerization steps could be summarized as follows: while the DNA pol is in an open conformation, the thumb domain closes around the DNA duplex (14). The incorporation of the nucleotide n+1 induces the fingers domain (i.e., helices N and P) to move away from the helix K and get closer to the palm domain and the enzyme adopts a closed conformation. The nucleotide is then transferred to the 3'-OH end of the

elongating DNA and the pyrophosphate is released. The fingers domain moves away from the palm domain and gets closer to the helix K and the DNA pol returns to an open conformation.

It has been suggested that PFA binds to and traps the DNA pol in its closed conformation (15). Some amino acid substitutions located in helices N and P (fingers domain) were shown to displace the equilibrium between the open and closed conformations to a more open form thereby reducing the affinity of PFA for the DNA pol and leading to drug resistance (15-19). We hypothesize that changes in residues located in helix K (NH₂-terminal domain) and region II (palm domain) that are involved in the open-to-closed conformational changes of the DNA pol may also affect the susceptibility of HSV-1 and HCMV to PFA. To investigate the impact of amino acid substitutions localized in these two regions on the susceptibility of herpesviruses to PFA, we used a strategy based on sequences alignment of the DNA pol of HSV-1 and HCMV, which are susceptible to PFA, and those of RB69 and T4 bacteriophages, which are naturally resistant to this antiviral. The proof of concept of this strategy was already demonstrated as the change of the V478 residue in helix N of the fingers domain of RB69 enzyme by the tryptophan located at an equivalent position in UL30 (W781) and UL54 (W780) renders the DNA pol of RB69 susceptible to PFA (18). Conversely, the opposite substitutions W781V (UL30) and W780V (UL54) lead to resistance of HSV-1 and HCMV to PFA (16). We thus identified a series of residues in helix K and region II that were different between the DNA pol of herpesviruses and those of bacteriophages (Fig. 1A/B). We characterized drug susceptibilities of recombinant HSV-1 and HCMV harboring these theoretical substitutions and that could be recovered in cell culture. We then evaluated the replicative capacity of recombinant viruses carrying substitutions associated with PFA resistance. We also determined the kinetics parameters of UL30 and UL54 DNA pol activity and their inhibition by PFA in enzymatic assays. Finally, we analyzed the impacts of these substitutions on the structure of DNA pol by using three-dimensional molecular modeling.

Results

Generation of recombinant viruses.

Most recombinant viruses harboring theoretical substitutions located in helix K (Q618I, I619K, T623A and L625I for HSV-1 and Q579I, I580K, T584A and L586I for HCMV) and in region II (V694Q, Q697P, P712Y, V715S and A719T for HSV-1 and V694Q, Q697P, V715S and A719T for HCMV) that were identified based on the sequences alignment of DNA pol of herpesviruses and bacteriophages could be generated as summarized in Fig. 1A/B. The characterization of Q579I (in

helix K of UL54) and V715S (in region II of UL30 and UL54) substitutions has already been described by our group (20, 21). Some recombinant viruses were too much impacted by the substitution to be able to grow in cell culture. Indeed, recombinant viruses harboring substitutions located in helix K of the enzyme such as Q617P, R620T and L626F for HSV-1 and their Q578P, R581T and L587F counterparts for HCMV were unable to grow after three independent transfection assays for both clones of each mutant virus (Fig. 1A/B). Similarly, recombinant HSV-1 and HCMV harboring the substitution F718L in region II of the DNA pol demonstrated a defective growth phenotype in cell culture. In contrast to its HSV-1 counterpart, recombinant HCMV carrying the P712Y substitution in region II was unable to grow.

Modeling of DNA polymerase mutants resulting in a viral growth defect.

Based on our 3D models of the closed forms of UL54 and UL30 DNA pol (derived from the DNA pol δ of *Saccharomyces cerevisiae* bound to a primer template DNA and an incoming nucleotide; PDB 3IAY), Q578 residue located in the helix K of UL54 DNA pol (or Q617 in UL30) establishes van der Waals interactions with the DNA template (Fig. 2A). The changes brought by the substitution Q578P could affect the main chain conformation, thereby preventing its binding to the DNA template. Moreover, the role of Q578 side chain in stabilizing the local structure, e.g., via its H-bonding with R581 (R620 in UL30) as well as van der Waals interactions with V812 and A816 (V812 and S816 in UL30) in the helix P of the fingers domain, could be crucial to maintain the overall conformation of the DNA pol required for their activity.

Furthermore, based on the crystal structure of the open form of UL30 (PDB 2GV9), the bulky and positively-charged R620 is very important to strengthen the local structure as evidenced by its van der Waals or H-bonding interactions with V601, V812, V813, S816, G616 and T612 (Fig. 2B). A similar role for the corresponding residue R581 was also demonstrated in the closed form of UL54 (Fig. 2C). All these interactions may be pivotal for the integrity of the local structure which establishes important direct contacts with both fingers domain (helix P) and the DNA molecule. Replacing the arginine by a much smaller threonine residue would inevitably cause the disruption of the local structure leading to an inactive DNA pol.

The introduction of a phenylalanine instead of the leucine at codon 626/587 in helix K (UL30/UL54) may also disrupt the local environment. In fact, the crystal structure of the open form of UL30 shows that introducing a bulkier side chain at this position seems unlikely to be compatible with the surrounding residues including E294, V297, R302 and L305 which are located in the NH₂-terminal domain (Fig. 2D). Therefore, this residue would be detrimental for the appropriate conformational changes required for the function of the DNA pol.

Residue P712 is located in region II of both UL30 and UL54 DNA pol. It is not directly involved in the interactions with the DNA molecule. The recombinant HSV-1 harboring the P712Y substitution is still viable likely because this amino acid change might be easily accommodated as it faces with a more flexible segment (A899-A900-G901) in the closed form of UL30 (Fig. 3A) than its counterpart (P923-Q924-A925) in UL54 (Fig. 3B) DNA pol. The P712Y substitution in the latter could not be tolerated as this change would cause steric hindrance between Y712 and its surrounding residues such as P923 and V955, resulting in the collapse of the local structure which will render the DNA pol either unstable or unable to bind the DNA molecule.

Residue F718, in both UL30 and UL54 DNA pol, establishes numerous van der Waals interactions with surrounding residues including L721, M844, L845, F918, I922 and L924 as shown in the crystal structure of the open form of UL30 (Fig. 3C). The shorter side chain of leucine compared to phenylalanine would most likely shift the main chain atoms in order to maintain the favorable interactions with the above-mentioned hydrophobic residues, which may cause its main carbonyl chain group as well as the carboxylate group of neighboring D717 to move away from their optimal positions for anchoring Mg^{2+} ions which are critical for the DNA pol activity (8, 13).

Thus, these results showed that these amino acids are important for the local structure of UL30 and UL54 DNA pol and that specific substitutions can lead to defective viruses.

Antiviral drug susceptibilities.

The different recombinant HSV-1 and HCMV mutants that were able to grow in cell culture were further evaluated for drug susceptibility. The EC_{50} (effective concentration that reduces plaque numbers by 50% compared to cells without drugs) values of PFA and ACV against the wild type (WT) recombinant HSV-1 were $52 \pm 20 \mu M$ and $0.039 \pm 0.018 \mu M$, respectively (Table 1). Recombinant HSV-1 harboring substitutions Q618I, T623A and L625I (in helix K) as well as V694Q, Q697P and P712Y (in region II) were all susceptible to PFA (0.18-, 0.96-, 1.6-, 1.7- 1.3- and 0.62-fold changes in mean EC_{50} values compared to WT, respectively). The substitution I619K (in helix K) was associated with both PFA and ACV resistance (2.5- and 2.1-fold increases in mean EC_{50} values compared to those of WT, respectively). Substitutions V715S and A719T (in region II) were associated with resistance to both PFA (5.6- and 2.0-fold increases in mean EC_{50} values compared to WT, respectively) and ACV (9.2- and 3.5-fold increases compared to WT, respectively) (21). All drug susceptibility testing were confirmed with a second clone (which corresponds to a second recombinant mutant virus generated independently from the first clone). Thus, substitution I619K in helix K as well as substitutions V715S and A719T in region II were found to confer resistance of HSV-1 to PFA.

The EC₅₀ (effective concentration that reduces the Gaussia luciferase (GLuc) activity by 50% compared to cells without drug) values of PFA and GCV against the WT recombinant HCMV were 28±6.7 μM and 2.2±1.2 μM, respectively (Table 2). Recombinant HCMV harboring substitutions I580K, T584A, L586I (in helix K) and V694Q (in region II) were susceptible to PFA (1.1-, 0.7-, 1.03- and 1.6- fold changes in mean EC₅₀ values compared to WT, respectively). The substitution Q579I located in helix K was associated with a hypersusceptibility phenotype to PFA (mean EC₅₀ values of 0.17-fold compared to WT) (20). Substitutions Q697P and A719T located in region II conferred resistance to PFA with increases in mean EC₅₀ values of 3.8- and 2.5-fold compared to those of WT, respectively. However, recombinant HCMV carrying substitutions Q697P and A719T were either susceptible or resistant to GCV (2.4-fold increase in the mean EC₅₀ compared to WT). We also previously showed that HCMV with substitution V715S is resistant to PFA and GCV (2.8- and 2.7-fold increases in EC₅₀ values compared to those of WT, respectively) (21). All drug susceptibility testing were confirmed with a second clone, except for the substitution I580K for which the second clone was susceptible to GCV (0.95-fold increase in EC₅₀ value compared to WT whereas the first clone was at the limit of resistance). Thus, substitution Q579I in helix K of UL54 DNA pol was associated with a hypersusceptibility phenotype to PFA whereas substitutions Q697P, V715S and A719T in region II conferred resistance to the drug.

Viral replicative capacity.

We then evaluated the replicative capacities of the WT and recombinant HSV-1 and HCMV mutants that were resistant to PFA. The replicative capacities of the WT and recombinant HSV-1 harboring substitutions I619K and A719T were determined in Vero cells using real-time cell analysis (RTCA). The cell indexes were recorded for three days post-infection. Results showed a significant decrease in the viral replicative capacity of recombinant I619K and A719T mutants on day 3 post-infection (P<0.01 and P<0.05, respectively) (Fig. 4A). We previously reported that the replicative capacity of recombinant HSV-1 harboring the substitution V715S was decreased by 1.5-fold compared to WT on day 3 post-infection (21).

The replicative capacities of the WT and recombinant HCMV carrying the substitutions Q697P and A719T were evaluated by using the GLuc reporter-based assay. The GLuc activity was measured in cell culture supernatants collected daily for 8 days. The viral growth of the Q697P mutant was significantly decreased compared to that of the WT on days 5 (P<0.01), 6, 7 (both P<0.001) and 8 (P<0.01) post-infection (Fig. 4B). The recombinant virus with substitution A719T exhibited an impaired growth in cell culture compared to the WT on days 5, 6, 7 (P<0.001 for the three) and 8 (P<0.05) post-infection. Furthermore, we previously showed that substitutions Q579I and V715S

were also associated to a decrease in the replicative capacity of HCMV mutants by 7.7- and 1.9-fold compared to the WT on day 8 post-infection, respectively (20, 21). Thus, substitutions located in helix K and region II of the DNA pol conferring resistance (UL30/UL54) or hypersusceptibility (UL54) to PFA were associated to a decrease in the viral replicative capacities.

Enzymatic activity of DNA polymerases and inhibition by foscarnet.

The impact of the amino acid substitutions conferring resistance to PFA on the kinetics parameters of the DNA pol activity and their drug inhibition was evaluated by a filter-based assay. The UL30 protein with I619K substitution showed a 0.42-fold decrease in the polymerase activity efficiency (ratio of apparent maximal velocity ($V_{\max(\text{app})}$) to apparent Michaelis-Menten constant ($K_{\text{m}(\text{app})}$) compared to the WT whereas that of the A719T mutant remained unchanged (0.97-fold) (Table 3). We previously showed that UL30 recombinant protein harboring the substitution V715S is also associated to a 0.50-fold decrease in the polymerase activity efficiency compared to the WT (21). As expected from the drug susceptibility testing, the apparent constant of inhibition ($K_{\text{i}(\text{app})}$) of PFA against UL30 proteins with substitutions I619K, V715S and A719T increased by 4.6-, 20.6- (21) and 5.0-fold compared to that of the WT, respectively.

The apparent polymerase activity efficiencies of UL54 proteins with substitutions Q697P and A719T were 0.29- and 0.72-fold lower than that of WT, respectively (Table 3). The polymerase activity efficiencies of UL54 recombinant proteins containing the substitutions Q579I and V715S were also decreased by 0.06- and 0.2-fold compared to those of WT, respectively, as reported elsewhere (20, 21). In accordance with the EC_{50} values of PFA against the corresponding recombinant HCMV mutants, the apparent K_{i} of PFA against UL54 proteins with substitutions Q697P, V715S and A719T increased by 3.4-, 16.0- (21) and 4.6-fold compared to WT, respectively. We also determined that the UL54 protein containing the substitution Q579I was hypersusceptible to PFA as its apparent K_{i} value was also decreased by 0.37-fold compared to WT (20). Thus, the resistance or hypersusceptibility phenotype of HSV-1 and HCMV to PFA conferred by substitutions located in helix K and region II of the DNA pol is reflected at the protein level as demonstrated by the changes in apparent K_{i} values of the drug and both were associated to decreased polymerase activity efficiencies.

Modeling of DNA polymerase mutants resistant to foscarnet.

Based on the crystal structure of the open form of UL30 DNA pol (PDB 2GV9), the I619K substitution might introduce an additional salt bridge with D615 side chain or an H-bond with its main carbonyl chain which might affect the salt bridge between D615 and K516 residues seen in the

WT protein (Fig. 5A). The interaction between R611 and D298 is not affected by the substitution. In the closed form model, however, K619 might affect R611 resulting in an interaction with D615 which may affect the orientation of the main chain of D615 compared to the open form (Fig. 5B). Another consideration is that, in the closed form we modeled, the beta-strand segment R500-K516 contains several positively-charged residues (R500, R512, K514 and K516), which might shift the conformation of D615 and make the interaction with K619 less desirable than with R611. Thus, the I619K mutant may adopt an open rather than a closed conformation of UL30 DNA pol. In contrast, the substitution Q579I, which was previously associated with a hypersusceptibility of HCMV to PFA, stabilizes the closed conformation of UL54 and shows a higher affinity of the drug for the protein (20).

In UL54 DNA pol, the Q697 residue is located in the palm domain that is important to anchor the backbone of the template DNA in the replication mode (closed form). While V694 is more distantly located from the DNA template in our model, Q697 is in the vicinity of the bound DNA molecule as the nearby G698 which establishes an H-bond with the DNA backbone (Fig. 6A). Based on our model, Q697 forms an H-bond with R839 in UL54 DNA pol. In contrast, the corresponding residue in UL30 is a shorter threonine (T839) that is not able to establish such an H-bond. This explains why the Q697P substitution in UL54 will probably make the DNA pol less stable in the closed form, leading to an increased EC_{50} value of the HCMV mutant to PFA.

Based on the DNA pol structures in the replication mode (closed form), A719 residue located in the palm domain is close to the DNA binding site. In the immediate environment of A719, upon the open-to-closed transition in UL54 (or UL30), the positively-charged residue R788 (or R789 in UL30) in the fingers domain moves toward the palm domain and forms a salt bridge with E949 (or E925 in UL30) (Fig. 6B). This salt bridge likely contributes to the stabilization of the closed conformation as indicated by our models of both UL30 and UL54 in closed forms. The A719T substitution in both UL54 and UL30 will likely disturb the above-mentioned salt bridge as the hydroxyl group of T719 would be within the H-bonding distance of the carboxylate group of E949 (or E925) and may change the conformation of the latter. Therefore, the substitution A719T would have deleterious effects on the transition of open-to-closed conformation or lead to a less stable closed form, which would result in an increased EC_{50} values of both mutant viruses to PFA. Substitution V715S located in region II of DNA pol is also associated with PFA resistance for both viruses. The V715 residue is close to the catalytic center of UL30 and UL54 DNA pol. The V715S substitution may disrupt local hydrophobic interactions. The destabilization of the local structure of the enzyme may affect the D717 residue that is critical to anchor the Mg^{2+} ions require for the binding of PFA as reported by our group (21).

Thus, UL30 and UL54 DNA pol harboring amino acid substitutions in the helix K and region II conferring resistance to PFA are less stable in the closed conformation and favor a more open form of the protein for which the drug has a lower affinity. In contrast, the Q579I substitution in helix K of UL54 DNA pol associated with a hypersusceptibility to PFA stabilizes the closed conformation which increases drug binding.

Discussion

Amino acid substitutions conferring resistance of HCMV to PFA are mainly distributed in the palm, fingers and NH₂-terminal domains of UL54 DNA pol whereas those associated with cross-resistance to PFA and GCV are located in the fingers domain (22). This suggests an important role of the fingers domain in the susceptibility of HCMV to PFA. The fingers domain is involved in the open-to-closed conformational changes of the DNA pol that occur following binding of the incoming nucleotide to the enzyme. Several studies have demonstrated that amino acid substitutions located in helices N and P of the fingers domain of UL54 DNA pol affect the susceptibility of HCMV to PFA (16, 17, 19). Most of these substitutions in helices N (W780V, V781I and V787E and P (L802M and A809V) confer resistance to PFA by favoring the open form of the enzyme to which the antiviral binds with a lower affinity. In contrast, the K805Q substitution in helix P is more stable in the closed conformation and is associated with a hypersusceptibility phenotype. In this study, we evaluated whether theoretical amino acid substitutions located in the helix K (NH₂-terminal domain) and region II (palm domain) that interact with the fingers domain during the open-to-closed conformational changes of the DNA pol affect the susceptibility of HSV-1 and HCMV to PFA. Our results showed that some amino acid substitutions in helix K and region II of UL30 and UL54 DNA pol can stabilize the proteins either in their open or closed conformation and thereby influence the susceptibility of HSV-1 and HCMV to PFA.

As already reported for amino acid changes in the helix P of the fingers domains (PFA resistance for L802M and A809V versus hypersusceptibility for K805Q) (17), substitutions located in the helix K of the NH₂-terminal domain can be also associated with two opposite drug susceptibility phenotypes. Indeed, the substitution I619K in UL30 DNA pol confer resistance of HSV-1 to PFA. Examination of the 3D models suggest that the mutated protein may adopt an open form rather than a closed conformation which decreases the binding affinity of PFA. In contrast, the substitution Q579I in UL54 DNA pol, and its equivalent Q618I in UL30, conferred increased susceptibility of HCMV and HSV-1 to PFA by favoring a closed conformation thereby increasing drug binding to the enzyme (20).

In conserved region II, a series of amino acid substitutions in UL30 (i.e., R700G, V715G and S724N) and UL54 (i.e., T700A, V715A/M and I726V) DNA pol were already reported to confer resistance of HSV-1 and HCMV to PFA (23-29). In our study, substitutions Q697P (UL54) and A719T (both UL30 and UL54) were associated with a decreased susceptibility to PFA. Three-dimensional modeling analyses comparing the mutated residues in the open and closed forms of the DNA pol revealed that these substitutions are less stable in the closed conformation and promote the open form of the enzyme with a reduced affinity of PFA.

The palm domain of the DNA pol of herpesviruses, which is composed of conserved regions II, I and VII, corresponds to the catalytic center of the enzyme. Region II contains a highly conserved DXXSLYPS motif (a.a. 717-724) (30). This motif, and especially the D717 and F718 residues, are implicated in the coordination of the two metal ions that are essential for the reaction of DNA polymerisation (31). It was reported that PFA establishes interactions with residues R784 and K811 of the fingers domain of UL54 DNA pol (corresponding to residues R785 and K811 in UL30) and chelates metal ion B, which interacts with the triphosphate tail of the incoming nucleotide (15). We previously reported that recombinant HCMV mutants harboring substitutions V715M/S are resistant to PFA (21). The V715 residue is close to the catalytic aspartate D717. Three-dimensional modeling analysis showed that the substitutions V715M/S in UL54 DNA pol may hinder the conformational change of the catalytic site of the enzyme that brings the carboxylate residue of D717 in contact with metal ion B, thereby reducing the binding of PFA. In HSV-1, the substitutions V715G/S in UL30 DNA pol were also associated with resistance to PFA by a similar mechanism.

Several parameters involved in the DNA polymerisation process (e.g., binding affinity of primer-template DNA and/or nucleotide for the enzyme, efficiency of nucleotide incorporation, fidelity of DNA replication and processivity of viral DNA synthesis) could be altered in UL30 and UL54 DNA pol mutants leading to reduced viral fitness compared to WT counterparts as shown in this study. Furthermore, a series of recombinant HSV-1 and HCMV strains harboring theoretical amino acid substitutions in helix K (Q617P, R620T and L626F in UL30 and their equivalent Q578P, R581T and L587F in UL54) and region II (F718L in UL30 and P712Y and F718L in UL54) were unable to grow in cell culture. Despite the fact that the recombinant mutant harboring the Q578P substitution exhibited a growth defect in cell culture, HCMV strains carrying other amino acid substitutions at the same position in UL54 DNA pol such as the Q578H/L displayed a normal growth (23, 32). This suggests that the non conservative change of the Q578 residue for a proline could markedly alter the structure of the DNA pol compared with a more conservative change for a valine or a leucine. Three-dimensional modeling analyses revealed that this substitution may disrupt the local structure of the DNA pol and affect the binding of the DNA molecule. A lack of viral growth

was also observed for several recombinant HCMV mutants harboring substitutions R581T, F718L and F718S in UL54 DNA pol (23). The R581 residue is involved in the binding of the DNA molecule and its change for a threonine may alter the local structure of the protein thereby reducing this interaction. Due to its close proximity to the catalytic aspartate D717, the substitution F718L may alter the interaction and the correct positioning of metal ion B that is essential for the enzyme activity (31). Overall, these amino acid changes may disrupt the local structure of the DNA pol and lead to a reduced enzyme activity that may explain the defect in viral growth. We cannot exclude, however, that the alterations of the local structure of the DNA pol could also prevent its interactions with other proteins involved in the replication complex such as their processivity factors (UL42/UL44 for UL30 and UL54 DNA pol, respectively).

Here, we emphasize the importance of the interactions between the fingers, the NH₂-terminal and the palm domains during the open-to-closed conformational changes of UL30 and UL54 DNA pol. As previously reported for helices N and P of the fingers domain, our results demonstrate that destabilization of the DNA pol conformation to the open form induced by amino acid substitutions in helix K and region II could be a potential mechanism of PFA resistance. In helix K, amino acid changes could also favor the closed conformation of the DNA pol to which PFA binds with a higher affinity resulting in a hypersusceptibility phenotype as previously shown for the K805Q substitution. The identification of key amino acids that are critical for the correct open-to-closed conformational changes of the DNA pol could allow the design of new antivirals aimed at preventing the fingers domain dynamics required for an optimal activity of the enzyme.

Materials and Methods

Cells.

African green monkey kidney cells (Vero) and human lung fibroblasts (MRC-5) were obtained from the American Type Culture Collection (Manassas, VA). Cells were maintained in minimal essential medium (MEM) plus 10% fetal bovine serum (FBS) (both from Gibco/Invitrogen, Burlington, Ontario, Canada) in a 5% CO₂ atmosphere.

Generation of recombinant HSV-1.

The HSV-1 genome (strain 17), split into 5 overlapping DNA cosmids (cos24, cos32, cos48, cos51 and cos71) obtained from C. Cunningham MRC Virology Unit, Glasgow, United Kingdom (33), was used in this study. The cosmid 71 was replaced by three plasmids (pNEB23, pNEB10 and pPOL6) (34) with pPOL6 plasmid containing the *UL30* gene. Selected mutations were introduced into the pPOL6 plasmid using the QuikChange site-directed mutagenesis kit (Stratagene, La Jolla,

CA). To reconstitute the entire HSV-1 genome, Vero cells seeded in 6-well plate were co-transfected with the set of overlapping cosmids and plasmids using Lipofectamine 2000 (Life Technologies, Burlington, Ontario, Canada). For each substitution, two sets of cosmids and plasmids were co-transfected in Vero cells to generate two independent recombinant viruses (two independent clones). The entire *UL30* gene in each mutated pPOL6 plasmids and recombinant viruses was sequenced to verify that only the expected mutation was introduced. Virus titers were determined by plaque assays on Vero cells.

Generation of recombinant HCMV.

The pHB5 bacmid, containing the genome of the HCMV strain AD169 and a bacterial artificial chromosome (BAC) (obtained from the laboratory of M. Messerle, Max von Pettenkofer Institut, Munich, Germany) was used in this study (35, 36). We previously integrated the *Gaussia luciferase* gene in the pHB5 bacmid (pHB5-GLuc) under the control of the HCMV major immediate-early promoter (37). Mutations were introduced into the *UL54* gene using “en passant mutagenesis” (37). For each substitution, two bacmids were transfected in MRC-5 cells to generate two independent recombinant viruses (two independent clones). MRC-5 cells were co-transfected with WT or mutant pHB5-GLuc and the pBKCMV82 plasmid, which contains the *UL82* gene encoding the pp71 protein. This protein was shown to increase the infectivity of the virus *in vitro* (38). The entire *UL54* gene in each mutated pHB5-GLuc and recombinant viruses was sequenced to verify that only the expected mutation was introduced. Virus titers were determined by plaque assays on MRC-5 cells.

Susceptibility of HSV-1 to antivirals.

Drug susceptibilities of recombinant HSV-1 were determined by plaque reduction assays on Vero cells. Briefly, cells seeded in 24-well plate (at 80% confluency) were infected with recombinant viruses at a MOI (multiplicity of infection) of 0.0001 for 1.5 h at 37°C in a 5% CO₂ atmosphere. Cells were then incubated with increasing concentrations of PFA [0-200 μM (drug susceptible viruses) or 0-400 μM (drug resistant viruses)] or ACV (0-1 μM) (both from Sigma-Aldrich, St. Louis, MO) in MEM plus 2% FBS containing 0.4% SeaPlaque agarose (Lonza, Rockland, ME). After three days, cells were fixed with 4% formalin, and stained with crystal violet. Cytopathic effects were counted under an inverted microscope to determine the EC₅₀ value that corresponds to the concentration of antiviral that reduces plaque numbers by 50% compared to cells without drugs. We considered that a recombinant HSV-1 mutant was resistant to a drug when its mean EC₅₀ value was statistically different from that of the WT as assessed by a one-way analysis of variance (ANOVA) with Dunnett post-test (see below).

Susceptibility of HCMV to antivirals.

Drug susceptibilities of recombinant HCMV were determined on MRC-5 cells using the GLuc reporter-based assay (37). Cells seeded in 24-well plate (at 80% confluency) were infected with recombinant viruses at a MOI of 0.001 for 1.5 h at 37°C in a 5% CO₂ atmosphere. Cells were then incubated with increasing concentrations of PFA (0-400 μM) or GCV (0-64 μM) (Sigma-Aldrich) in MEM plus 2% FBS. Volumes of 30 μl of cell culture supernatants were transferred to a black 96-well plate. The coelenterazine (NanoLight Technology, Pinetop, AZ) substrate (50 μl) was added to each well (37) and the GLuc activity was measured using a VICTOR 3000 plate reader (Victor3; PerkinElmer, Waltham, MA) with an acquisition time of 1 s. The EC₅₀ value, corresponding to the concentration of antiviral that reduces the GLuc activity by 50% compared to cells without drugs, was determined. We considered that a recombinant HCMV mutant was resistant to a drug when its mean EC₅₀ value was statistically different from that of the WT as assessed by a one-way ANOVA with Dunnett post-test (see below).

Replicative capacity of HSV-1 by real-time cell analysis.

The RTCA system (xCELLigence; ACEA Biosciences, Inc., San Diego, CA) was used to determine the replicative capacity of the WT and the different HSV-1 mutants in Vero cells (39). Cells were seeded in a 96-well E-plate that contains a microelectronic sensor array which allows the system to measure the impedance. The differences in the impedance over time reflect changes in the cell growth and morphology, and is represented by a parameter called the cell index (CI). After 48 h, cells (at 80% confluency) were infected with recombinant viruses at a MOI of 0.01 in MEM plus 2% FBS for 1.5 h at 37°C in a 5% CO₂ atmosphere. Viral suspensions were then removed and cells were incubated with MEM plus 2% FBS for an additional 3 days. The impedance was recorded every 30 min. Data were represented as 1/cell index measured at selected time points to better compare the replicative capacity of the different recombinant viruses.

Replicative capacity of HCMV by the Gaussia luciferase reporter-based assay.

The replicative capacity of recombinant HCMV was determined using the GLuc reporter-based assay (37). MRC-5 cells were seeded in a 24-well plate. After 48 h, cells (at 80% confluency) were incubated with the WT and the different recombinant mutants (MOI of 0.001) for 1.5 h at 37°C in a 5% CO₂ atmosphere. Viral suspensions were then removed and replaced by MEM plus 2% FBS. Cell culture supernatants (30 μl) were collected daily for 8 days and transferred to a black 96-well plate to determine the GLuc activity as described above.

Enzymatic activity of DNA polymerases and inhibition by foscarnet.

The *UL30* (from HSV-1 strain 17; GenBank number: X14112.1) and *UL54* (from HCMV strain AD169; GenBank number: X17403.1) genes were cloned into the pCITE4a plasmid (EMD BioScience, San Diego, CA) using NdeI/NcoI and NdeI/SacI restriction sites, respectively (16, 40). Selected mutations were introduced in *UL30* or *UL54* gene using QuikChange site-directed mutagenesis kit (Stratagene). Both proteins were expressed by an *in vitro* transcription-translation system using reticulocyte lysates of rabbits (Promega Biosystems, Sunnyvale, CA) as previously reported (41). Protein expression was performed at 37°C for 3 h and 0.2 mg/ml of bovine serum albumin was added at the end of the reaction. The steady-state kinetics parameters of viral DNA pol and their inhibition by PFA were then determined by a filter-based assay (17). Activated calf thymus DNA was used as template. The reaction was performed in a mixture containing: 25 mM Tris-HCl (pH 8.0), 90 mM NaCl, 0.5 mM dithiothreitol, 5% glycerol, 1 μ M [³H]-dGTP (specific activity, 8 to 13 Ci/mmol; Moravsek, Brea, CA), increasing concentrations (0 to 5 μ M) of the other dNTPs (dATP, dCTP, and dTTP; New England BioLabs, Ltd, Whitby, Ontario, Canada), 0.1 mg/ml activated calf thymus DNA (Amersham Biosciences, Piscataway, NJ) and 1 μ l of the enzyme-containing transcription-translation mixture. The total volume was then adjusted to 25 μ l with water. The reaction was started by the addition of 10 μ l MgCl₂ (10 mM final concentration) and mixtures were incubated at 37°C for 30 min and stopped by the addition of 600 μ l pre-chilled 5% trichloroacetic acid (TCA)–1% sodium pyrophosphate (NaPPi). Reaction mixtures were maintained on ice for 10 min to precipitate the DNA and then filtered through a Millipore Multiscreen 1.2 μ m pore size glass fiber C 96-well filtration plate (EMD Millipore, Billerica, MA). Filters were then washed twice with 250 μ l of pre-chilled 5% TCA–1% NaPPi and with approximately 350 μ l of 99% ethanol. Drug inhibition of DNA pol activity was determined by adding in the reaction mixture described above increasing concentrations of PFA (0-4 μ M) while maintaining a total volume of 25 μ l. At the end of the reaction, filters were removed and placed into vials containing Ecolite(+) scintillation liquid cocktail (MP Biomedicals, Solon, OH) to measure radioactivity. The average observed rates of enzymatic activity versus substrate concentrations data (in the absence and presence of PFA) were fitted simultaneously according to nonlinear equation for non-competitive inhibition to calculate the apparent maximal velocity ($V_{\max(\text{app})}$), the apparent Michaelis-Menten constant ($K_{\text{m}(\text{app})}$) and the apparent constant of inhibition ($K_{\text{i}(\text{app})}$) values by the use of GraphPad Prism® software (version 8.00; GraphPad Software Inc., San Diego, CA). The polymerase activity efficiency was calculated as the ratio of $V_{\max(\text{app})}$ to $K_{\text{m}(\text{app})}$.

Three-dimensional modeling.

The crystal structure of the open form of HSV-1 UL30 DNA pol (PDB 2GV9) was used. The open form of HCMV was obtained by homology modeling based on the 2GV9 structure. The structure of herpesvirus DNA pol bound to a primer-template has not been resolved yet. The closed forms of both HCMV and HSV-1 DNA pol were thus built by homology modeling with the crystal structure of the closed form of the DNA pol δ of *Saccharomyces cerevisiae* (which is closely related to the family B DNA pol) bound to a primer-template DNA and an incoming nucleotide (PDB 3IAY). The DNA molecule was derived from the structure of the closed form of yeast DNA pol δ (PDB 3IAY). In some analyses, the magnesium ions and the PFA molecule derived from the crystal structure of the RB69 DNA pol (PDB 3KD5) were included in the closed form model of UL54 upon superposition. The homology modeling was performed using the Swiss-Model server (42).

Statistical analyses.

The GraphPad Prism software (version 8.00) was used for all statistical analyses. A two-way ANOVA with Bonferroni post hoc test was used to compare the replicative capacities of recombinant mutant viruses to those of the WT. A one-way ANOVA with Dunnett post-test was used to compare EC₅₀ values and kinetics parameters of mutant viruses to those of the WT. A P value < 0.05 was considered as statistically significant.

Acknowledgements

This study was supported by a Foundation Grant from the Canadian Institutes of Health Research (grant no. 148361 to G.B.). The structural analysis was partially supported by a Natural Sciences and Engineering Research Council discovery grant (grant no. 436202) to R.S. G.B. is the holder of the Canada research chair on emerging viruses and antiviral resistance.

Data Policy

The datasets generated and analyzed during the current study are available from the corresponding author upon request.

Competing interests

The authors have no competing interest to declare.

References

1. Andrei G, de Clercq E, Snoeck R. 2009. Viral DNA polymerase inhibitors, p 481-526. In Cameron CE, Gotte M, Raney K (ed), *Viral genome replication*. Springer, New York.
2. Andrei G, De Clercq E, Snoeck R. 2009. Drug targets in cytomegalovirus infection. *Infect Disord Drug Targets* 9:201-222.
3. Xiong X, Smith JL, Chen MS. 1997. Effect of incorporation of cidofovir into DNA by human cytomegalovirus DNA polymerase on DNA elongation. *Antimicrob Agents Chemother* 41:594-599.
4. Lurain NS, Chou S. 2010. Antiviral drug resistance of human cytomegalovirus. *Clin Microbiol Rev* 23:689-712.
5. Piret J, Boivin G. 2014. Antiviral drug resistance in herpesviruses other than cytomegalovirus. *Rev Med Virol* 24:186-218.
6. Kim ES. 2018. Letermovir: First Global Approval. *Drugs* 78:147-152.
7. Braithwaite DK, Ito J. 1993. Compilation, alignment, and phylogenetic relationships of DNA polymerases. *Nucleic Acids Res* 21:787-802.
8. Franklin MC, Wang J, Steitz TA. 2001. Structure of the replicating complex of a pol alpha family DNA polymerase. *Cell* 105:657-667.
9. Wang J, Sattar AK, Wang CC, Karam JD, Konigsberg WH, Steitz TA. 1997. Crystal structure of a pol alpha family replication DNA polymerase from bacteriophage RB69. *Cell* 89:1087-1099.
10. Shamoo Y, Steitz TA. 1999. Building a replisome from interacting pieces: sliding clamp complexed to a peptide from DNA polymerase and a polymerase editing complex. *Cell* 99:155-166.
11. Brautigam CA, Steitz TA. 1998. Structural and functional insights provided by crystal structures of DNA polymerases and their substrate complexes. *Curr Opin Struct Biol* 8:54-63.
12. Steitz TA. 1999. DNA polymerases: structural diversity and common mechanisms. *J Biol Chem* 274:17395-17398.
13. Liu S, Knafels JD, Chang JS, Waszak GA, Baldwin ET, Deibel MR, Jr., Thomsen DR, Homa FL, Wells PA, Tory MC, Poorman RA, Gao H, Qiu X, Seddon AP. 2006. Crystal structure of the herpes simplex virus 1 DNA polymerase. *J Biol Chem* 281:18193-18200.
14. Zarrouk K, Piret J, Boivin G. 2017. Herpesvirus DNA polymerases: Structures, functions and inhibitors. *Virus Res* 234:177-192.
15. Zahn KE, Tchesnokov EP, Gotte M, Doublet S. 2011. Phosphonoformic acid inhibits viral replication by trapping the closed form of the DNA polymerase. *J Biol Chem* 286:25246-25255.
16. Piret J, Goyette N, Eckenroth BE, Drouot E, Gotte M, Boivin G. 2015. Contrasting effects of W781V and W780V mutations in helix N of herpes simplex virus 1 and human cytomegalovirus DNA polymerases on antiviral drug susceptibility. *J Virol* 89:4636-4644.
17. Tchesnokov EP, Gilbert C, Boivin G, Gotte M. 2006. Role of helix P of the human cytomegalovirus DNA polymerase in resistance and hypersusceptibility to the antiviral drug foscarnet. *J Virol* 80:1440-1450.
18. Tchesnokov EP, Obikhod A, Schinazi RF, Gotte M. 2009. Engineering of a chimeric RB69 DNA polymerase sensitive to drugs targeting the cytomegalovirus enzyme. *J Biol Chem* 284:26439-26446.
19. Piret J, Schibler M, Pham VD, Hantz S, Giannotti F, Masouridi-Levrat S, Kaiser L, Goyette N, Alain S, Shi R, Boivin G. 2019. Compartmentalization of a multidrug-resistant cytomegalovirus UL54 mutant in a stem cell transplant recipient with encephalitis. *J Infect Dis* 220:1302-1306.
20. Zarrouk K, Pham VD, Piret J, Shi R, Boivin G. 2020. Hypersusceptibility of human cytomegalovirus to foscarnet induced by mutations in helices K and P of the viral DNA polymerase. *Antimicrob Agents Chemother* 64:e01910-01919.
21. Zarrouk K, Zhu X, Goyette N, Piret J, Shi R, Boivin G. 2021. Differential impact of various substitutions at codon 715 in region II of HSV-1 and HCMV DNA polymerases. *Antiviral Res* 188:105046.

22. Topalis D, Gillemot S, Snoeck R, Andrei G. 2016. Distribution and effects of amino acid changes in drug-resistant alpha and beta herpesviruses DNA polymerase. *Nucleic Acids Res* 44:9530-9554.
23. Chou S, Boivin G, Ives J, Elston R. 2014. Phenotypic evaluation of previously uncharacterized cytomegalovirus DNA polymerase sequence variants detected in a valganciclovir treatment trial. *J Infect Dis* 209:1219-1226.
24. Baldanti F, Underwood MR, Stanat SC, Biron KK, Chou S, Sarasini A, Silini E, 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* 70:1390-1395.
25. Fischer L, Imrich E, Sampaio KL, Hofmann J, Jahn G, Hamprecht K, Gohring K. 2016. Identification of resistance-associated HCMV UL97- and UL54-mutations and a UL97-polymorphism with impact on phenotypic drug-resistance. *Antiviral Res* 131:1-8.
26. Cihlar T, Fuller MD, Mulato AS, Cherrington JM. 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* 248:382-393.
27. Frobert E, Burrel S, Ducastelle-Lepretre S, Billaud G, Ader F, Casalegno JS, Nave V, Boutolleau D, Michallet M, Lina B, Morfin F. 2014. Resistance of herpes simplex viruses to acyclovir: an update from a ten-year survey in France. *Antiviral Res* 111:36-41.
28. Saijo M, Yasuda Y, Yabe H, Kato S, Suzutani T, De Clercq E, Niikura M, Maeda A, Kurane I, Morikawa S. 2002. Bone marrow transplantation in a child with Wiskott-Aldrich syndrome latently infected with acyclovir-resistant (ACV(r)) herpes simplex virus type 1: emergence of foscarnet-resistant virus originating from the ACV(r) virus. *J Med Virol* 68:99-104.
29. Schmit I, Boivin G. 1999. Characterization of the DNA polymerase and thymidine kinase genes of herpes simplex virus isolates from AIDS patients in whom acyclovir and foscarnet therapy sequentially failed. *J Infect Dis* 180:487-490.
30. Bennett N, Gotte M. 2013. Utility of the bacteriophage RB69 polymerase gp43 as a surrogate enzyme for herpesvirus orthologs. *Viruses* 5:54-86.
31. Liu S, Homa FL. 2009. Atomic structure of the herpes simplex virus 1 DNA polymerase, p 365-381. In Cameron CE, Gotte M, Raney K (ed), *Viral genome replication*. Springer, New York.
32. Mousavi-Jazi M, Schloss L, Drew WL, Linde A, Miner RC, Harmenberg J, Wahren B, Brytting M. 2001. Variations in the cytomegalovirus DNA polymerase and phosphotransferase genes in relation to foscarnet and ganciclovir sensitivity. *J Clin Virol* 23:1-15.
33. Cunningham C, Davison AJ. 1993. A cosmid-based system for constructing mutants of herpes simplex virus type 1. *Virology* 197:116-124.
34. Bestman-Smith J, Boivin G. 2003. Drug resistance patterns of recombinant herpes simplex virus DNA polymerase mutants generated with a set of overlapping cosmids and plasmids. *J Virol* 77:7820-7829.
35. Brune W, Messerle M, Koszinowski UH. 2000. Forward with BACs: new tools for herpesvirus genomics. *Trends Genet* 16:254-259.
36. Borst EM, Hahn G, Koszinowski UH, Messerle M. 1999. Cloning of the human cytomegalovirus (HCMV) genome as an infectious bacterial artificial chromosome in *Escherichia coli*: a new approach for construction of HCMV mutants. *J Virol* 73:8320-8329.
37. Drouot E, Piret J, Boivin G. 2013. Novel method based on "en passant" mutagenesis coupled with a *Gussia* luciferase reporter assay for studying the combined effects of human cytomegalovirus mutations. *J Clin Microbiol* 51:3216-3224.
38. Baldick CJ, Jr., Marchini A, Patterson CE, Shenk T. 1997. Human cytomegalovirus tegument protein pp71 (ppUL82) enhances the infectivity of viral DNA and accelerates the infectious cycle. *J Virol* 71:4400-4408.

39. Piret J, Goyette N, Boivin G. 2016. Novel method based on real-time cell analysis for drug susceptibility testing of herpes simplex virus and human cytomegalovirus. *J Clin Microbiol* 54:2120-2127.
40. Martin M, Azzi A, Lin SX, Boivin G. 2010. Opposite effect of two cytomegalovirus DNA polymerase mutations on replicative capacity and polymerase activity. *Antivir Ther* 15:579-586.
41. Cihlar T, Fuller MD, Cherrington JM. 1997. Expression of the catalytic subunit (UL54) and the accessory protein (UL44) of human cytomegalovirus DNA polymerase in a coupled in vitro transcription/translation system. *Protein Expr Purif* 11:209-218.
42. Waterhouse A, Bertoni M, Bienert S, Studer G, Tauriello G, Gumienny R, Heer FT, de Beer TAP, Rempfer C, Bordoli L, Lepore R, Schwede T. 2018. SWISS-MODEL: homology modelling of protein structures and complexes. *Nucleic Acids Res* 46:W296-W303.
43. Schrodinger KK. 2010. The PyMOL Molecular Graphics System, version 1.3rl. . Schrödinger LLC.

Figures and tables

A

```

RB69-gp43 :361 - P I K T W D A I I F N S L K E - 375
T4-gp43   :358 - P I K T W D A I I F N S L K G - 371
HSV-1-UL30:617 - Q Q I R V F T C L L R L A D Q - 631
HCMV-UL54 :578 - Q Q I R I Y T S L L D E C A C - 592
  
```

Helix K (in NH₂-terminal domain)

Region	HSV-1 mutation	Drug susceptibility	HCMV mutation	Drug susceptibility
Helix K	Q617P	Unable to grow ¹	Q578P	Unable to grow ²
	Q618I	PFA ^S /ACV ^S	Q579I ³	PFA ^{HS} /GCV ^S
	I619K	PFA ^R /ACV ^R	I580K	PFA ^S /GCV ^{S/R}
	R620T	Unable to grow ¹	R581T	Unable to grow ²
	T623A	PFA ^S /ACV ^S	T584A	PFA ^S /GCV ^S
	L625I	PFA ^S /ACV ^R	L586I	PFA ^S /GCV ^S
	L626F	Unable to grow ¹	L587F	Unable to grow ²

B

```

RB69-gp43 :389 - Q P Y P G A F V K E P I P N A Y - K Y V M S F D L T S L Y P - 417
T4-gp43   :386 - Q S F P G A F V F E P K P I A R - R Y I M S F D L T S L Y P - 414
HSV-1-UL30:694 - V G Y Q G A R V L D P T S G F H V N P V V V F D F A S L Y P - 723
HCMV-UL54 :694 - V S Y Q G A T V F E P E V G Y Y N D P V A V F D F A S L Y P - 723
  
```

Region II (in palm domain)

Region	HSV-1 mutation	Drug susceptibility	HCMV mutation	Drug susceptibility
Region II	V694Q	PFA ^S /ACV ^S	V694Q	PFA ^S /GCV ^S
	Q697P	PFA ^S /ACV ^S	Q697P	PFA ^R /GCV ^S
	P712Y	PFA ^S /ACV ^R	P712Y	Unable to grow ²
	V715S ⁴	PFA ^R /ACV ^R	V715S ⁴	PFA ^R /GCV ^R
	F718L	Unable to grow ¹	F718L	Unable to grow ²
	A719T	PFA ^R /ACV ^R	A719T	PFA ^R /GCV ^R

FIG1: Alignment of amino acid sequences of helix K (A) and region II (B) of DNA pol of RB69 and T4 bacteriophages (gp43) with DNA pol of HSV-1 (UL30) and HCMV (UL54). Amino acids that are different between bacteriophages and herpesviruses DNA pol (indicated in bold) were selected and theoretical substitutions were introduced in recombinant HSV-1 and HCMV. Both tables summarize

drug susceptibility profiles of recombinant HSV-1 and HCMV mutants recovered in cell culture as well as those that were unable to grow. Amino acid substitutions indicated in red are those conferring resistance or hypersusceptibility to foscarnet (PFA) and which were further investigated. 1, Three different cosmids and plasmids transfections were attempted without success for each of the two independent clones. 2, Three different bacmid transfections were attempted without success for each of the two independent clones. 3, From (20). 4, From (21). R, resistant; S, susceptible; HS, hypersusceptible; ACV, acyclovir; GCV, ganciclovir.

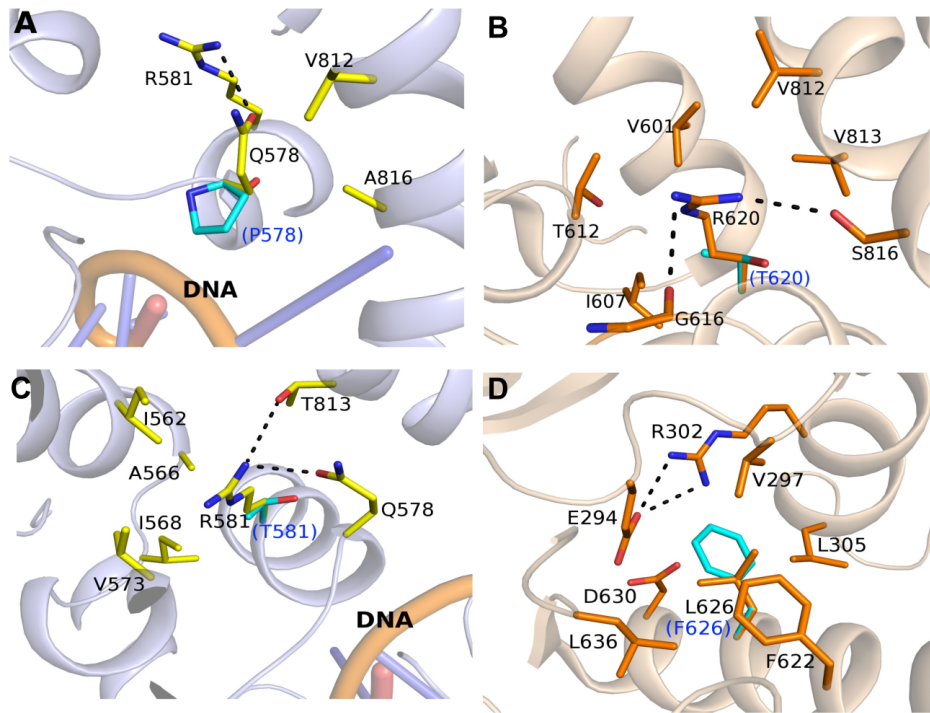


FIG 2: Local environments of amino acid substitutions associated to a viral growth defect and located in the helix K of UL30 and UL54 DNA polymerases. The cartoon representations of UL54 closed form and UL30 open form (crystal structure PDB 2GV9) are colored in light blue and wheat, respectively. (A) Structural model of Q578 and surrounding residues in the closed form of UL54 DNA pol. Q578 interacts with R581 (H-bond) and V812 and A816 (van der Waals interactions). The substitution Q578P would lead to the loss of these interactions and may be detrimental to DNA binding. (B) The residue R620 in the open form of UL30 DNA pol has an important role in maintaining the local structure by two H-bonds (with G616 and S816) and numerous van der Waals interactions. (C) The residue R581 in the closed form of UL54 DNA pol (R620 in UL30) is involved in the stabilization of the structure to accommodate the binding of the DNA molecule. (D) Crystal structure of UL30 DNA pol showing both hydrophobic and hydrophilic residues in the immediate environment of L626. Introducing a bulkier hydrophobic phenylalanine at residue 626 will disrupt the local structure that is maintained by interactions between hydrophilic residues E294 and R302. The H-bonds are shown in dashed lines. The carbon atoms of mutated residues (labeled in blue and in brackets) are shown in cyan. The DNA molecule is derived from the structure of the closed form of yeast DNA pol δ (PDB 3IAY). This figure was prepared by using PyMol (43).

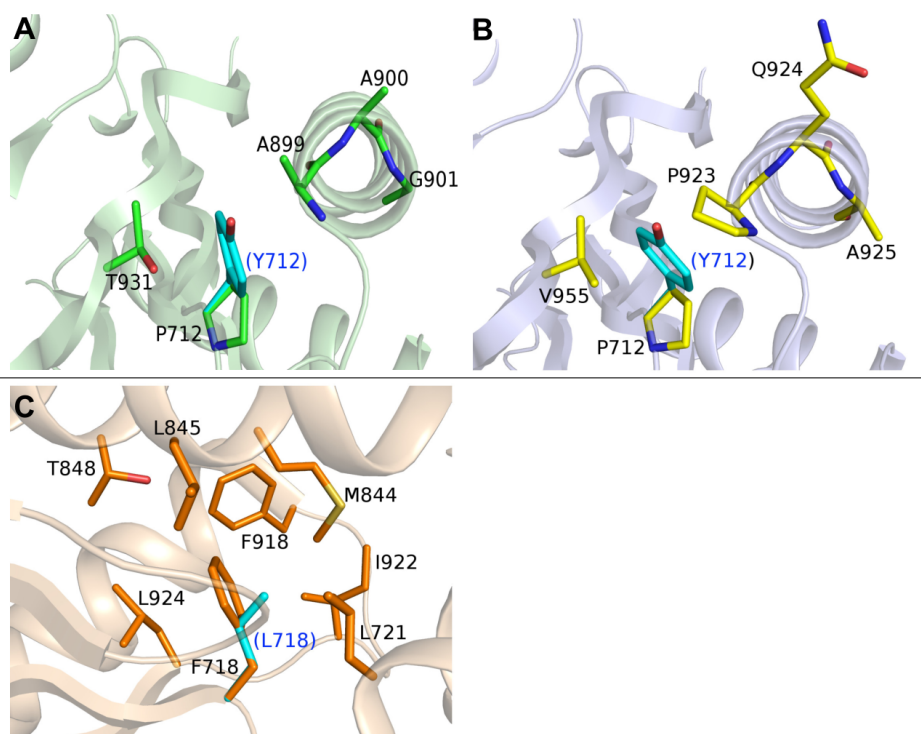


FIG 3: Local environments of amino acid substitutions associated to a viral growth defect and located in the region II of UL30 and UL54 DNA polymerases. The cartoon representations of UL30 closed form, UL54 closed form and UL30 open form (crystal structure PDB 2GV9) are colored in pale green, light blue and wheat, respectively. (A) The local structure of P712 in the closed form of UL30 DNA pol. The substitution P712Y may be accommodated here as P712 faces a segment containing short side chains (A899-A900-G901) which might be more flexible. (B) P712 in the closed form of UL54 DNA pol faces the segment P923-Q924-A925 which may be less flexible to be compatible with the bulky tyrosine introduced by the P712Y substitution. (C) Crystal structure of UL30 DNA pol showing a compact hydrophobic pocket for F718. The substitution F718L will be detrimental to the local structure as the nearby secondary structures could not be maintained in the presence of a smaller leucine at this position. The carbon atoms of mutated residues (labeled in blue and in brackets) are shown in cyan. This figure was prepared by using PyMol (43).

TABLE 1 Antiviral drug susceptibilities of the wild type and the different recombinant HSV-1 mutants.

Recombinant virus	EC ₅₀ values ± SD in μM (fold change) ¹ [n]		
	Foscarnet	Acyclovir	
rvHSV-1 WT	52±20 (1) [n=23]	0.039±0.018 (1) [n=18]	
Helix K	rvHSV-1 Q618I-1	9.3±1.1 (0.18) [n=3] ^{ns}	0.055±0.007 (1.5) [n=3] ^{ns}
	rvHSV-1 Q618I-2	9.20 (0.16) [n=1]	0.063 (1.6) [n=1]
	rvHSV-1 I619K-1	129±69 (2.5) [n=3]^{***}	0.08±0.02 (2.1) [n=3]^{**}
	rvHSV-1 I619K-2	123 (2.3) [n=1]	0.083 (2.1) [n=1]
	rvHSV-1 T623A-1	49±6.4 (0.96) [n=3] ^{ns}	0.051±0.008 (1.4) [n=3] ^{ns}
	rvHSV-1 T623A-2	74 (1.4) [n=1]	0.038 (1.01) [n=1]
	rvHSV-1 L625I-1	82±21 (1.6) [n=3] ^{ns}	0.09±0.015 (2.4) [n=3]^{***}
	rvHSV-1 L625I-2	46 (0.87) [n=1]	0.105 (2.8) [n=1]
Region II	rvHSV-1 V694Q-1	91±26 (1.7) [n=3] ^{ns}	0.048±0.011 (1.3) [n=3] ^{ns}
	rvHSV-1 V694Q-2	55 (1.05) [n=1]	0.042 (1.1) [n=1]
	rvHSV-1 Q697P-1	66±15 (1.3) [n=3] ^{ns}	0.056±0.010 (1.5) [n=3] ^{ns}
	rvHSV-1 Q697P-2	79 (1.5) [n=1]	0.071 (1.8) [n=1]
	rvHSV-1 P712Y-1	33±5.5 (0.62) [n=3] ^{ns}	0.14±0.021 (3.7) [n=3]^{***}
	rvHSV-1 P712Y-2	28.1 (0.5) [n=1]	0.26 (6.8) [n=1]
	rvHSV-1 V715S ²	289±24 (5.6) [n=3]^{***}	0.36±0.12 (9.2) [n=3]^{***}
	rvHSV-1 A719T-1	104±32 (2.0) [n=3]^{**}	0.13±0.005 (3.5) [n=3]^{***}
	rvHSV-1 A719T-2	170 (3.2) [n=1]	0.19 (5.1) [n=1]

EC₅₀, 50% effective concentration; WT, wild type; rv, recombinant virus.

¹, Fold change compared to the WT rvHSV-1. ², EC₅₀ values from reference (21). A one-way analysis of variance (ANOVA) with Dunnett post-test (GraphPad Prism, Version 8.00) was used to compare EC₅₀ values of mutant viruses to those of the WT. **, $P < 0.01$; ***, $P < 0.001$; ^{ns}, non-significant compared to WT. EC₅₀ values that are statistically different from those of the WT were considered to induce drug resistance (shown in bold) (this correlates with an increase of the EC₅₀ values ≥ 2-fold compared to those of the WT counterparts). Results are the mean ± SD of three to twenty-three independent experiments [n] for clone 1; clone 2 was tested only once.

TABLE 2 Antiviral drug susceptibilities of the wild type and the different recombinant HCMV mutants.

Recombinant virus	EC ₅₀ values ± SD in μM (fold change) ¹ [n]	
	Foscarnet	Ganciclovir
rvHCMV WT	28±6.7 (1) [n=18]	2.2±1.2 (1) [n=19]
rvHCMV Q579I ²	4.8±0.57 (0.17) [n=3] ***	0.93±0.21 (0.42) [n=3] ^{ns}
rvHCMV I580K-1	32±10.2 (1.1) [n=3] ^{ns}	4.6±2.5 (2.1) [n=3] *
rvHCMV I580K-2	27 (0.96) [n=1]	2.1±0.012 (0.95) [n=2]
rvHCMV T584A-1	19±1.7 (0.7) [n=3] ^{ns}	2.2±0.47 (1.06) [n=3] ^{ns}
rvHCMV T584A-2	20 (0.71) [n=1]	3.1 (1.5) [n=1]
rvHCMV L586I-1	29±9.4 (1.03) [n=3] ^{ns}	1.2±0.41 (0.56) [n=3] ^{ns}
rvHCMV L586I-2	38 (1.3) [n=1]	1.9 (0.89) [n=1]
rvHCMV V694Q-1	42±9.3 (1.6) [n=3] ^{ns}	1.05±0.1 (0.49) [n=3] ^{ns}
rvHCMV V694Q-2	48 (1.7) [n=1]	3.7 (1.7) [n=1]
rvHCMV Q697P-1	104±38 (3.8) [n=3] ***	1.6±0.41 (0.71) [n=3] ^{ns}
rvHCMV Q697P-2	70 (2.5) [n=1]	3.8 (1.8) [n=1]
rvHCMV V715S ³	78±14 (2.8) [n=4] ***	5.9±1.6 (2.7) [n=4] **
rvHCMV A719T-1	69±12 (2.5) [n=3] ***	5.2±2.4 (2.4) [n=4] **
rvHCMV A719T-2	66 (2.4) [n=1]	5.01 (2.3) [n=1]

EC₅₀, 50% effective concentration; WT, wild type; rv, recombinant virus.

¹, Fold change compared to the WT rvHCMV. ², EC₅₀ values from reference (20). ³, EC₅₀ values from reference (21). A one-way analysis of variance (ANOVA) with Dunnett post-test (GraphPad Prism, Version 8.00) was used to compare EC₅₀ values of mutant viruses to those of the WT. *, $P < 0.05$; **, $P < 0.01$; ***, $P < 0.001$; ^{ns}, non-significant compared to WT. EC₅₀ values that are statistically different from those of the WT were considered to induce drug resistance or hypersusceptibility (shown in bold) (this correlates with an increase (resistance) or a decrease (hypersusceptibility) of the EC₅₀ values ≥ 2 -fold compared to those of the WT counterparts). Results are the mean ± SD of three to nineteen independent experiments [n] for clones 1; clones 2 were tested only once or twice (I580K).

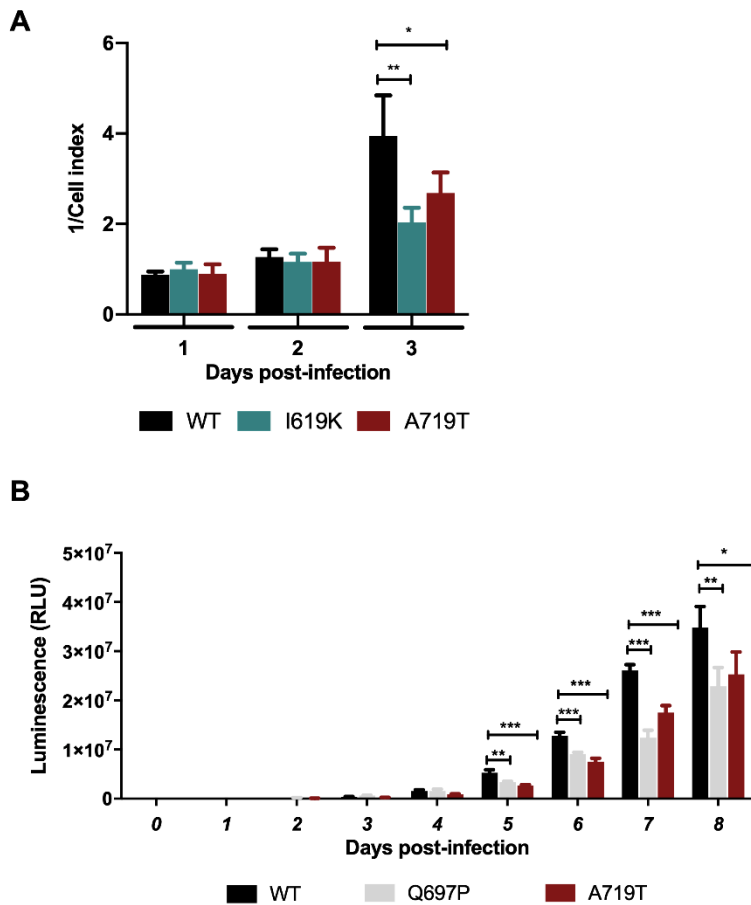


FIG 4: Replicative capacity of the wild type (WT) and different recombinant HSV-1 and HCMV mutants. (A) The replicative capacity of the WT and the different recombinant HSV-1 mutants harboring substitutions conferring resistance to foscarnet (I619K and A719T in UL30) were determined by real-time cell analyses. Vero cells were infected with the different recombinant viruses at a multiplicity of infection (MOI) of 0.01. Cell indexes were recorded every 30 min for 3 days. We used the 1/Cell index on selected days post-infection to analyze the impact of each substitution on the replicative capacity of recombinant viruses compared to the WT. Data represent the mean \pm SD of six replicates and are representative of three independent experiments. (B) The replicative capacity of the WT and the different recombinant HCMV harboring substitutions conferring resistance to foscarnet (Q697P and A719T in UL54) were evaluated by the Gaussia luciferase (GLuc) reporter-based assay. MRC-5 cells were infected with the different recombinant viruses at a MOI of 0.001. Supernatants were collected daily for 8 days and the GLuc activity was measured. Results are expressed as relative light units (RLU). Data represent the mean \pm SD of six replicates and are representative of three independent experiments. *, $P < 0.05$; **, $P < 0.01$; ***, $P < 0.001$.

TABLE 3 Steady-state kinetics parameters and drug inhibition of wild type and recombinant DNA pol mutants conferring resistance to foscarnet.

Recombinant proteins	<u>Steady-state kinetics parameters</u>				<u>Inhibition by PFA</u>	
	$V_{\max(\text{app})}$ (fmol/min)	$K_{\text{m}(\text{app})}$ (μM)	$V_{\max(\text{app})}/K_{\text{m}(\text{app})}$	Fold change	$K_{\text{i}(\text{app})}$ (μM)	Fold change
UL30-WT	26.39 \pm 1.6	0.98 \pm 0.27	27.04	1.00	0.22 \pm 0.07	1.00
UL30-I619K	27.7 \pm 11.96 ^{ns}	2.45 \pm 1.19 ^{ns}	11.30	0.42	0.97 \pm 0.28*	4.6
UL30-A719T	71.2 \pm 11.09**	2.71 \pm 0.85 ^{ns}	26.29	0.97	1.08 \pm 0.54*	5.0
UL54-WT	5.41 \pm 2.47	0.60 \pm 0.16	8.98	1.00	0.25 \pm 0.04	1.00
UL54-Q697P	9.30 \pm 4.37 ^{ns}	3.5 \pm 0.14*	2.7	0.29	0.83 \pm 0.08**	3.4
UL54-A719T	22.7 \pm 9.1*	3.5 \pm 1.2*	6.5	0.72	1.1 \pm 0.15**	4.6

WT, Wild type; $V_{\max(\text{app})}$, Apparent maximum velocity; $K_{\text{m}(\text{app})}$, Apparent Michaelis-Menten constant; $K_{\text{i}(\text{app})}$, Apparent constant of inhibition. Fold changes of $V_{\max(\text{app})}/K_{\text{m}(\text{app})}$ and $K_{\text{i}(\text{app})}$ compared to WT values. A one-way analysis of variance (ANOVA) with Dunnett post test (GraphPad Prism, Version 8.00) was used to compare the enzymatic parameters of mutant proteins to those of WT. *, $P<0.05$; **, $P<0.01$; ^{ns}, non-significant compared to WT. K_{i} values that are statistically different from those of the WT were considered to induce drug resistance. Results represent the mean \pm SD of 3 independent experiments.

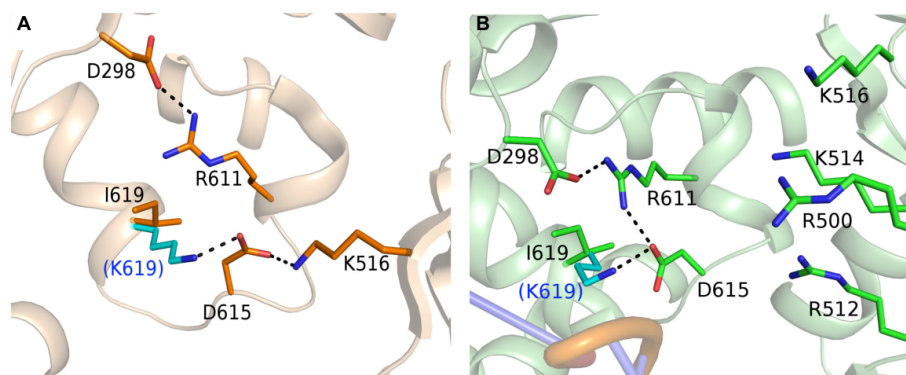


FIG 5: Local environments of amino acid substitutions conferring resistance to foscarnet in the helix K of UL30 DNA polymerase. The cartoon representations of UL30 open form (crystal structure PDB 2GV9) and UL30 closed form are colored in wheat and pale green, respectively. (A) The I619K substitution in UL30 DNA pol may stabilize the open conformation due to the additional salt bridge formed between K619 and D615. (B) Model of the closed form of UL30 DNA pol indicates that I619K substitution may destabilize the local structure due to its vicinity to R611 because D615 may rotate toward a cluster of positively-charged residues (e.g., R500 and R512) upon the transition from the open-to-closed conformation. The H-bonds are shown in dashed lines. The carbon atoms of mutated residues (labeled in blue and in brackets) are shown in cyan. The DNA molecule is derived from the structure of the closed form of yeast DNA pol δ (PDB 3IAY). This figure was prepared by using PyMol (43).

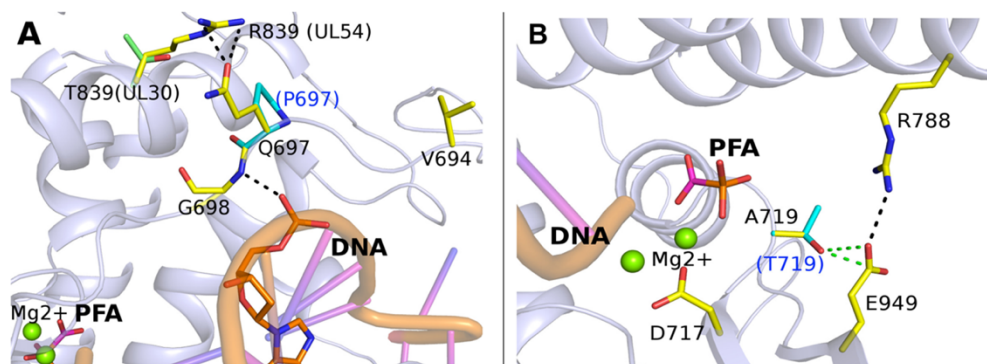


FIG 6: Local environments of amino acid substitutions conferring resistance to foscarnet in the region II of UL54 DNA polymerase. Cartoon representation of UL54 closed form is colored in light blue. (A) The residue Q697 is in the vicinity of the DNA molecule (G698 establishes an H-bond with the DNA backbone) whereas V694 is distant from the bound DNA molecule. Q697 forms an H-bond with R839 in the palm domain in UL54 whereas this interaction is absent in UL30 due to a much shorter T839 residue at the corresponding position. (B) The environment of A719 is shown in the closed form model of UL54 DNA pol. The salt bridge formed between R788 and E949 seems important to bring the fingers domain (R788) closer. The substitution A719T may result in new H-bonds (shown in green dashed lines) between T719 and E949 and could thus decrease the interaction of the latter with R788. The H-bonds are shown in dashed lines. The carbon atoms of mutated residues (labeled in blue and in brackets) are shown in cyan. The DNA molecule is derived from the structure of the closed form of yeast DNA pol δ (PDB 3IAY). The magnesium ions are shown in green spheres while the foscarnet molecule (PFA) is shown in stick mode (phosphate, carbon and oxygen atoms are represented in orange, purple and red sticks, respectively), both of which were derived from the crystal structure of the RB69 DNA pol (PDB 3KD5) upon superposition. This figure was prepared by using PyMol (43).

Chapitre 3 : Hypersensibilité du cytomégalo­virus humain au foscarnet induite par des mutations dans les hélices K et P de l'ADN polymérase virale

3.1 Résumé

La substitution théorique Q579I (hélice K, domaine NH₂-terminal) confère une hypersensibilité du CMV au FOS. Afin de mieux comprendre les mécanismes impliqués dans ce processus, nous avons caractérisé cette mutation en la comparant à la substitution K805Q (hélice P, domaine des doigts) déjà connue pour induire une hypersensibilité du CMV au FOS. Des tests d'inhibition de l'activité des ADN pol recombinantes mutantes par le FOS ont montré que les protéines étaient également hypersensibles au FOS. Nous avons observé une diminution des capacités répl­icatives des deux virus recombinants (Q579I, K805Q) ainsi que des activités de polymérisation des protéines recombinantes possédant ces deux mutations. Les modélisations 3D des protéines mutées montraient que ces ADN pol favorisaient une conformation plus fermée pour laquelle le FOS a une affinité plus élevée. Par inférence, ces résultats appuient l'hypothèse que les mutations associées à une résistance au FOS favoriseraient une conformation plus ouverte de la protéine.

3.2 Abstract

The theoretical substitution Q579I (helix K, NH₂-terminal domain) is associated to a hypersusceptibility of CMV to FOS. We generated recombinant viruses harboring the Q579I and K805Q (helix P, fingers domain) substitutions; the latter is already known to induce hypersusceptibility of CMV to FOS and was used as a control in our experiments. The hypersusceptibility profile was confirmed by enzymatic inhibition assays of recombinant DNA pol mutants by FOS. Furthermore, we observed a decrease of the replicative capacities of recombinant viruses with Q579I and K805Q substitutions that was also associated to a decrease of the polymerization activity of the recombinant protein mutants. Three-dimensional models showed that both mutations favored a closed conformation of the proteins for which FOS has a higher affinity. These results reinforce the hypothesis that mutations associated to FOS resistance would confer a more open conformation of the protein.

3.3 Article

Hypersusceptibility of Human Cytomegalovirus to Foscarnet Induced by Mutations in Helices K and P of the Viral DNA Polymerase

Running Title: Hypersusceptibility of cytomegalovirus to foscarnet

Karima Zarrouk¹, Van Dung Pham², Jocelyne Piret¹, Rong Shi² and Guy Boivin^{1, #}

¹, Research center in infectious diseases, CHU de Québec- Laval University, Quebec City, QC, Canada. ², Department of Biochemistry, Microbiology and Bioinformatics, PROTEO, and Institute of Integrative and Systems Biology, Laval University, Quebec City, QC, Canada

Abstract word count: 74

Text word count: 1 474

Figures: 2

Tables: 2

Supplemental materials: 1

#, Correspondent footnote:
Dr Guy Boivin
Centre de recherche en infectiologie
CHU de Québec- Université Laval
2705, Blvd Laurier, R-0709
Québec (QC)
Canada, G1V 4G2
E-mail: Guy.Boivin@crchudequebec.ulaval.ca

Abstract

Herein, we characterized phenotypically and enzymatically the theoretical mutation Q579I in helix K and the already described clinical mutation K805Q in helix P of cytomegalovirus DNA polymerase for susceptibility to foscarnet. Q579I and K805Q recombinant viruses were hypersusceptible to foscarnet (respective mean EC_{50} 's of 0.12- and 0.19-fold that of wild type). Three dimensional modeling analysis suggested that both mutations favor the closed conformation of the enzyme to which foscarnet binds with a higher affinity.

Keywords: Human cytomegalovirus, hypersusceptibility, resistance, foscarnet, DNA polymerase, molecular modeling

Human cytomegalovirus (HCMV) infections cause serious morbidity and mortality in immunocompromised patients (1). The first line antiviral agents for the treatment of HCMV infections are ganciclovir (GCV; a guanosine analogue) and its prodrug valganciclovir whereas second line drugs include foscarnet (PFA; a pyrophosphate analogue) and cidofovir (CDV; a cytidine monophosphate analogue) (2). All these antivirals target the viral DNA polymerase (pol) encoded by the *UL54* gene, a key enzyme in the viral replication process (3). Following activation by viral and/or cellular kinases, GCV triphosphate and CDV diphosphate are incorporated into DNA during polymerization to slow down the viral DNA pol activity and ultimately stop chain elongation (2). PFA directly binds to the viral DNA pol and prevents the release of pyrophosphate during DNA elongation (2). However, long-term prophylaxis or treatment with these antiviral agents may lead to drug resistance and treatment failure (4).

Following incorporation of the correct nucleotide, the fingers domain (i.e., helices N and P) of *UL54* DNA pol moves towards the palm domain and the enzyme shifts from an open to a closed conformation (3). Furthermore, it is suggested that helix K could also influence the conformational changes of the enzyme (5). Foscarnet exerts its inhibitory effects by trapping the DNA polymerase in its closed form (6). By using a strategy based on sequences alignment of the DNA pol of herpesviruses and bacteriophages (Fig. 1A) that present different susceptibilities to PFA (7), we identified a theoretical mutation, Q579I, located in helix K that conferred increased susceptibility to PFA. In this paper, we sought to gain insight into the mechanism of hypersusceptibility mediated by this mutation using recombinant phenotyping, enzyme kinetics and molecular modeling approaches.

Mutations Q579I and K805Q (previously detected in a clinical specimen and shown to be hypersusceptible to PFA (8-10)) were introduced in the *UL54* gene of a bacmid using “en passant” mutagenesis (11). The bacmid consists of the genome of HCMV strain AD169 and a bacterial artificial chromosome which contains the *Gaussia luciferase* (GLuc) gene (described elsewhere (11)). For each mutation, two bacmids were transfected in MRC-5 cells to generate two independent recombinant viruses. The entire *UL54* gene was sequenced in all bacmids and recombinant viruses.

Replicative capacities of the WT and HCMV mutants were determined by the GLuc reporter-based assay using cell culture supernatants collected daily for 8 days (11). MRC-5 cells seeded in 24-well plates at 80% confluency were infected with recombinant viruses at a multiplicity of infection of 0.001 for 1h30 at 37°C. Cell culture supernatants were then collected daily for 8 days and the coelenterazine substrate (NanoLight Technology) was added to determine the GLuc activity. The

replicative capacities of all mutant viruses were significantly reduced compared to that of the WT from days 5 to 8 post-infection ($P < 0.001$; Fig. 1B).

Susceptibilities of wild type (WT) and two clones of recombinant HCMV mutants were determined using the GLuc reporter-based assay (11). MRC-5 cells infected with recombinant viruses were incubated with increasing concentrations of PFA (0-400 μM for the WT or 0-100 μM for hypersusceptible viruses) and GCV (0-64 μM) (both from Sigma-Aldrich) in minimal essential medium plus 2% fetal bovine serum (both from Gibco/Invitrogen). Cell culture supernatants were collected on day 6 post-infection. The effective concentration (EC_{50}) of antiviral that reduces the GLuc activity by 50% compared to cells incubated without drug was calculated. The EC_{50} values of PFA and GCV against the recombinant WT virus were $28 \pm 7.1 \mu\text{M}$ and $2.3 \pm 1.3 \mu\text{M}$, respectively (Table 1). The mean EC_{50} values of PFA against Q579I and K805Q mutants were 0.12- and 0.19-fold that of WT and these mutants were thus considered as hypersusceptible to this drug. The phenotype of hypersusceptibility to PFA is not the result of an altered viral replicative capacity as mutations that confer resistance to PFA such as the Q578H, have also been reported to reduce viral growth (12). The Q579I mutant was hypersusceptible to GCV (0.29-fold WT EC_{50} value) whereas mutation K805Q did not affect GCV susceptibility of the virus. We observed some variability between the drug EC_{50} values determined for the two clones of Q579I mutant. This may be due to the occurrence of unwanted mutations in the HCMV genome during the recombination steps in bacteria and constitutes a limitation of "en passant" mutagenesis. This highlights the need to use two independent clones of a recombinant virus to confirm a drug resistance/hypersusceptibility phenotype.

Mutations Q579I and K805Q were introduced in the *UL54* gene cloned into a pCITE4a plasmid (EMD BioScience) by site-directed mutagenesis (8) and the entire *UL54* gene was sequenced to confirm that only the expected mutation was present. All proteins were expressed by an *in vitro* transcription-translation system using reticulocyte lysates of rabbit (Promega Biosystems) as previously described (13). The steady-state kinetics parameters [apparent maximal velocity ($V_{\text{max}(\text{app})}$) and Michaelis-Menten constant ($K_{\text{m}(\text{app})}$)] of WT and mutant DNA pol proteins and their inhibition by PFA [apparent inhibition constant ($K_{\text{i}(\text{app})}$) and 50% inhibitory concentration (IC_{50})] were then determined by a filter-based assay (See Supplemental Materials) (8, 9). In accordance with the viral growth of recombinant viruses in cell culture, the polymerase activity efficiencies (calculated as $V_{\text{max}(\text{app})}/K_{\text{m}(\text{app})}$) of mutant proteins based on the incorporation of dCTP were decreased compared to that of WT (0.74, 3.3 and 12 for Q579I, K805Q and WT proteins, respectively) (Table 2). The $K_{\text{i}(\text{app})}$ values were respectively reduced by 0.37- and 0.32-fold for Q579I and K805Q DNA pol mutants compared to WT. Furthermore, the IC_{50} values of PFA against Q579I and K805Q mutant proteins

were respectively 0.2- and 0.3-fold those of WT DNA pol. The $K_{m(\text{app})}$ value of Q579I mutant was 3.7-fold higher than that of WT suggesting that this mutation could also affect substrate recognition but not the K805Q mutation.

Since the crystal structure of UL54 protein is not yet available, the impact of Q579I and K805Q mutations on DNA pol structure was thus analyzed using homology models. We generated both the open and closed forms of UL54 through the Swiss-model server based on the crystal structures of UL30 DNA pol of herpes simplex virus 1 apo enzyme (PDB 2GV9) (14) and the yeast DNA pol delta complexed with DNA (PDB 3IAY) (15), respectively, as done previously (16). The positioning of the DNA molecule and PFA was obtained by superposing the closed form of the chimeric RB69 DNA polymerase bound with DNA and PFA (PDB 3KD5) (6) onto our closed model. Based on our models, the Q579I mutation in helix K might lead to the loss of three H-bonds established in the open form between the side chain of Q579 and the main chain amide of M827 and the main chain carbonyl groups of both F820 and M827 (Fig. 2, top left). On the other hand, this mutation may also further stabilize the closed form as the side chain of I579 would be more snugly packed against the hydrophobic side chains of F820 and V823 of helix P in the closed form (Fig. 2, top right). Similarly, the K805Q mutation in helix P likely destabilizes the open conformation and facilitates the equilibrium towards the closed one as the H-bonds formed between the positively charged K805 and the carbonyl group of I553 and the carboxylate group of E558 in the open conformation (Fig. 2, bottom left) might be less likely to be maintained by introducing here a shorter and neutral glutamine residue (Q805). This mutation might also provide a better fit for Q805 to form an H-bond to the carbonyl group of K493 and meanwhile would be more compatible (than positively charged K805) with the relatively hydrophobic environment formed by Y508, I553 and L802 in the closed form (Fig. 2, bottom right).

Hypersusceptibility of HCMV to PFA conferred by mutations in helices K and P of UL54 DNA pol is potentially achieved through a stabilization of the closed form or a destabilization of the open form by shifting the equilibrium towards the closed form for which PFA has a higher affinity. Furthermore, by stabilizing the closed form (replication mode), the Q579I mutation could facilitate the incorporation of GCV triphosphate into DNA resulting in a higher drug susceptibility for this mutant. Residue 805 is likely positioned at distance from the DNA molecule compared to the residue 579, this may be one potential reason why K805Q mutant is less susceptible to GCV. Nevertheless, without the crystal structures of relevant complexes, this reasoning remains speculative. A series of mutations located in helix K of UL54 DNA pol, namely, Q578H/L, S585A and D588E/N, were shown to confer resistance to PFA (4, 12, 17, 18). Thus, changes in susceptibility to PFA resulting from

mutations in helix K of HCMV suggest that structural modifications in this helix may influence the proper open/closed conformational changes of DNA pol. This could help the rational design of new antivirals that could interfere with the conformational changes of the fingers domain of DNA pol that are crucial for enzymatic activity.

Acknowledgments

This study was supported by a Foundation Grant from the Canadian Institutes of Health Research (grant no. 148361 to G.B.). The structural analysis was partially supported by a NSERC discovery grant (#436202) to R.S. G.B. is the holder of the Canada research chair on emerging viruses and antiviral resistance.

Data Policy

The datasets generated and analyzed during the current study are available from the corresponding author upon request.

References

1. **Steininger C.** 2007. Clinical relevance of cytomegalovirus infection in patients with disorders of the immune system. *Clin Microbiol Infect* **13**:953-963.
2. **Andrei G, De Clercq E, Snoeck R.** 2009. Drug targets in cytomegalovirus infection. *Infect Disord Drug Targets* **9**:201-222.
3. **Zarrouk K, Piret J, Boivin G.** 2017. Herpesvirus DNA polymerases: Structures, functions and inhibitors. *Virus Res* **234**:177-192.
4. **Lurain NS, Chou S.** 2010. Antiviral drug resistance of human cytomegalovirus. *Clin Microbiol Rev* **23**:689-712.
5. **Piret J, Goyette N, Eckenroth BE, Drouot E, Gotte M, Boivin G.** 2015. Contrasting effects of W781V and W780V mutations in helix N of herpes simplex virus 1 and human cytomegalovirus DNA polymerases on antiviral drug susceptibility. *J Virol* **89**:4636-4644.
6. **Zahn KE, Tchesnokov EP, Gotte M, Doublet S.** 2011. Phosphonoformic acid inhibits viral replication by trapping the closed form of the DNA polymerase. *J Biol Chem* **286**:25246-25255.
7. **Bennett N, Gotte M.** 2013. Utility of the bacteriophage RB69 polymerase gp43 as a surrogate enzyme for herpesvirus orthologs. *Viruses* **5**:54-86.
8. **Martin M, Azzi A, Lin SX, Boivin G.** 2010. Opposite effect of two cytomegalovirus DNA polymerase mutations on replicative capacity and polymerase activity. *Antivir Ther* **15**:579-586.
9. **Tchesnokov EP, Gilbert C, Boivin G, Gotte M.** 2006. Role of helix P of the human cytomegalovirus DNA polymerase in resistance and hypersusceptibility to the antiviral drug foscarnet. *J Virol* **80**:1440-1450.
10. **Cihlar T, Fuller MD, Cherrington JM.** 1998. Characterization of drug resistance-associated mutations in the human cytomegalovirus DNA polymerase gene by using recombinant mutant viruses generated from overlapping DNA fragments. *J Virol* **72**:5927-5936.
11. **Drouot E, Piret J, Boivin G.** 2013. Novel method based on "en passant" mutagenesis coupled with a Gaussia luciferase reporter assay for studying the combined effects of human cytomegalovirus mutations. *J Clin Microbiol* **51**:3216-3224.
12. **Chou S.** 2011. Phenotypic diversity of cytomegalovirus DNA polymerase gene variants observed after antiviral therapy. *J Clin Virol* **50**:287-291.
13. **Cihlar T, Fuller MD, Cherrington JM.** 1997. Expression of the catalytic subunit (UL54) and the accessory protein (UL44) of human cytomegalovirus DNA polymerase in a coupled in vitro transcription/translation system. *Protein Expr Purif* **11**:209-218.
14. **Liu S, Knafels JD, Chang JS, Waszak GA, Baldwin ET, Deibel MR, Jr., Thomsen DR, Homa FL, Wells PA, Tory MC, Poorman RA, Gao H, Qiu X, Seddon AP.** 2006. Crystal structure of the herpes simplex virus 1 DNA polymerase. *J Biol Chem* **281**:18193-18200.

15. **Swan MK, Johnson RE, Prakash L, Prakash S, Aggarwal AK.** 2009. Structural basis of high-fidelity DNA synthesis by yeast DNA polymerase delta. *Nat Struct Mol Biol* **16**:979-986.
16. **Piret J, Schibler M, Pham VD, Hantz S, Giannotti F, Masouridi-Levrat S, Kaiser L, Goyette N, Alain S, Shi R, Boivin G.** 2019. Compartmentalization of a Multidrug-Resistant Cytomegalovirus UL54 Mutant in a Stem Cell Transplant Recipient with Encephalitis. *J Infect Dis* **220**:1301-1306.
17. **Chou S, Boivin G, Ives J, Elston R.** 2014. Phenotypic evaluation of previously uncharacterized cytomegalovirus DNA polymerase sequence variants detected in a valganciclovir treatment trial. *J Infect Dis* **209**:1219-1226.
18. **Gilbert C, Azzi A, Goyette N, Lin SX, Boivin G.** 2011. Recombinant phenotyping of cytomegalovirus UL54 mutations that emerged during cell passages in the presence of either ganciclovir or foscarnet. *Antimicrob Agents Chemother* **55**:4019-4027.

Figures and tables

A

RB69-gp43	:361	-	PIKTWDAIIFNSLKE	-	375
T4-gp43	:358	-	PIKTWDAIIFNSLKG	-	371
HSV-1-UL30	:617	-	QQIRVFTCLLRADQ	-	731
HCMV-UL54	:578	-	QQIRIYTSLLDECAC	-	592

Helix K

B

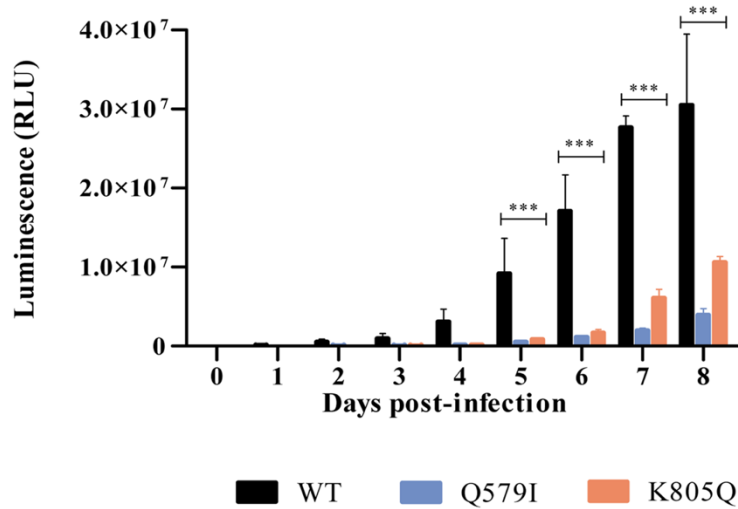


FIG 1: (A) Sequences alignment of the helix K of DNA pol of bacteriophages RB69 and T4 (gp43; both resistant to PFA) with DNA pol of herpes simplex virus 1 (HSV-1; UL30) and human cytomegalovirus (HCMV; UL54) (both susceptible to PFA). (B) Replicative capacity of wild type (WT) and recombinant HCMV harboring different mutations (Q579I and K805Q) in *UL54* gene that confer hypersusceptibility to PFA. The Gaussia luciferase (GLuc) reporter-based assay was used to determine the replicative capacity of WT and mutant recombinant HCMV in MRC-5 cells. Cells were infected with the different recombinant viruses at a MOI of 0.001. Cell culture supernatants were collected daily for 8 days and the GLuc activity was measured. Data represent the means \pm SD of six replicates and are representative of three experiments with the first clone. A two-way analysis of variance (ANOVA) with Bonferroni post hoc test (GraphPad Prism, Version 8.3.0) was used to compare the viral replicative capacity of mutant viruses to the WT. RLU: relative light units. ***, $P < 0.001$ compared to WT.

Table 1: Antiviral drug susceptibilities of recombinant wild type (WT) and mutant human cytomegalovirus.

Recombinant virus (rv)	EC ₅₀ values ± SD in μM (fold change) [§] [n]	
	Foscarnet	Ganciclovir
rvHCMV WT	28±7.1 (1) [n=15]	2.3±1.3 (1) [n=15]
rvHCMV Q579I-1	4.8±0.57 (0.16-0.19) [n=3]^{***}	0.93±0.21 (0.31-0.50) [n=3]^{ns}
rvHCMV Q579I-2	1.9±0.38 (0.05-0.08) [n=3]^{***}	0.37±0.09 (0.12-0.19) [n=3][*]
rvHCMV K805Q-1	4.9±2.5 (0.07-0.29) [n=4]^{***}	3.7±1.4 (0.96-2.2) [n=3] ^{ns}
rvHCMV K805Q-2	5.5±3.1 (0.10-0.39) [n=3]^{***}	2.2±0.01 (0.96-0.97) [n=3] ^{ns}

EC₅₀: effective concentration of antiviral that reduces the Gaussia luciferase activity by 50%; WT: wild type.

[§], Fold change ranges correspond to the lowest and highest EC₅₀ values of recombinant viruses compared to rvHCMV WT. Results are the mean ± SD of three to fifteen independent experiments [n]. A one-way analysis of variance (ANOVA) with Dunnett post test (GraphPad Prism, Version 8.00) was used to compare EC₅₀ values of mutant viruses to those of the WT. *, P<0.05; ***, P<0.001; ^{ns}, non-significant compared to WT. EC₅₀ values that are statistically different from those of WT were considered to induce drug hypersusceptible and results are shown in bold.

Table 2: Steady-state kinetics parameters of recombinant wild type and mutant DNA pol proteins and inhibition of enzymatic activity by foscarnet.

Recombinant proteins	<u>Steady-state kinetics parameters</u>				<u>Inhibition by PFA</u>			
	$V_{\max(\text{app})}$ (fmol/min)	$K_{\text{m}(\text{app})}$ (μM)	$V_{\max(\text{app})}/K_{\text{m}(\text{app})}$	Fold change	$K_{\text{i}(\text{app})}$ (μM)	Fold change	IC_{50} (μM)	Fold change
WT	7.3±1.6	0.70±0.41	12±3.8	1.0	0.67±0.26	1.0	1.2±0.13	1.0
Q579I	1.8±0.5	2.6±0.51	0.74±0.34**	0.06	0.25±0.13*	0.37	0.25±0.15***	0.2
K805Q	3.0±1.1	0.9±0.3	3.3±0.3**	0.27	0.22±0.07*	0.32	0.35±0.15***	0.3

Results represent the mean \pm SD of 3 to 5 independent experiments; WT: Wild type; $V_{\max(\text{app})}$: Apparent maximum velocity, $K_{\text{m}(\text{app})}$: Apparent Michaelis-Menten constant, $K_{\text{i}(\text{app})}$: Apparent constant of inhibition, IC_{50} : 50% inhibitory concentration.

Fold changes of $V_{\max(\text{app})}/K_{\text{m}(\text{app})}$, $K_{\text{i}(\text{app})}$ and IC_{50} compared to WT values. A one-way analysis of variance (ANOVA) with Dunnett post test (GraphPad Prism, Version 8.00) was used to compare the enzymatic parameters of mutant proteins to those of WT. *, $P < 0.05$; **, $P < 0.01$; ***, $P < 0.001$. The average observed rates of enzymatic activity *versus* substrate concentrations data (in the absence and presence of foscarnet) were fitted simultaneously according to nonlinear equation for non-competitive inhibition to calculate the apparent constant of inhibition (K_{i}) value by the use of GraphPad Prism® software. The percentage of inhibition of enzymatic activity (compared to control without drug added) was also plotted against the logarithm of foscarnet concentrations. A dose-response inhibition curve was then fitted by a least-squares method by the use of GraphPad Prism software to calculate the concentration that reduces by 50% the enzymatic activity (IC_{50}).

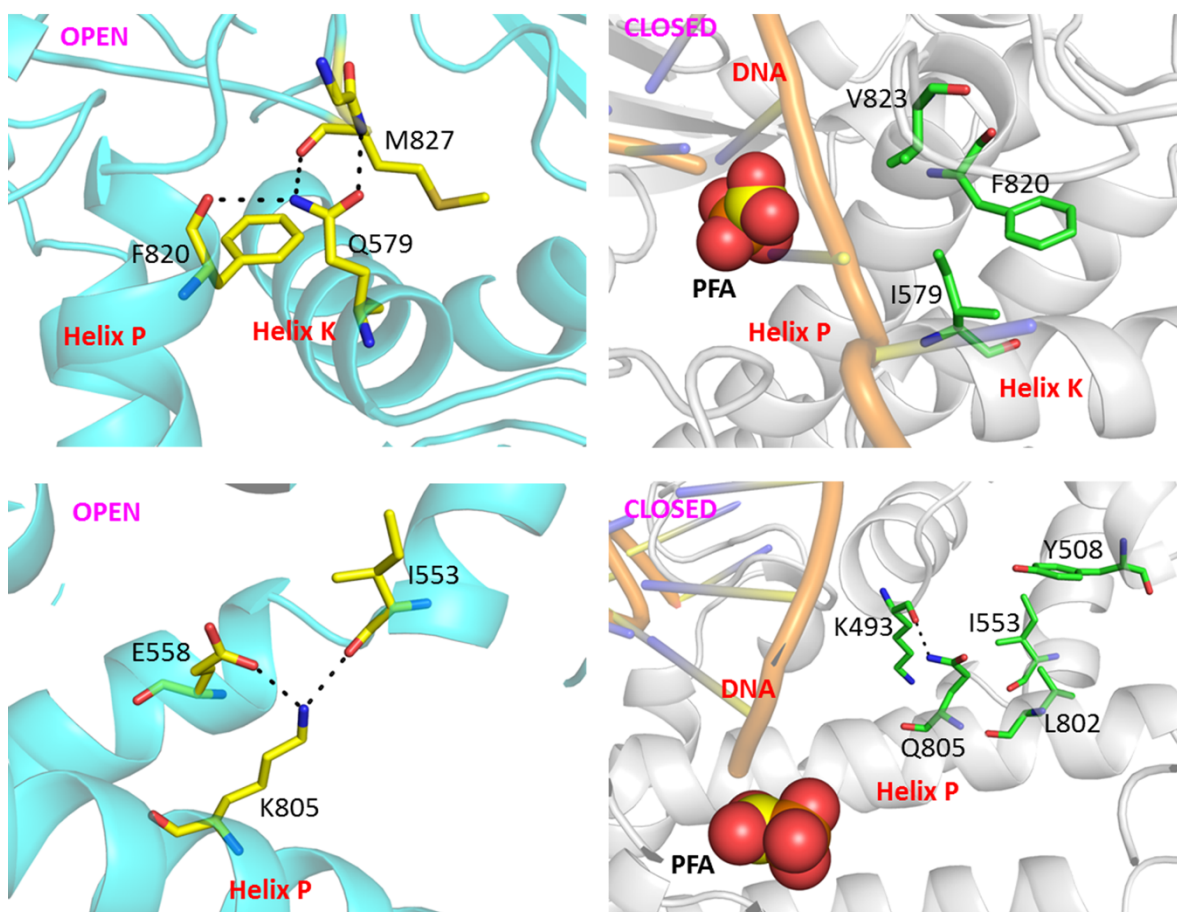


FIG 2: Local environment of residues 579 (upper panels) and 805 (lower panels) in both WT and mutant UL54 proteins based on our homology modeling. Hydrogen bonds are shown in dash lines and the residues are shown in stick mode. The cartoon representation of open and closed forms are colored in cyan and gray, respectively. The DNA and foscarnet molecules were shown based on the superposition of the crystal structure of DNA- and foscarnet-bound RB69 DNA polymerase (PDB 3KD5) with our closed form model.

Supplemental Material

Filter-based assay for DNA polymerase enzymatic activity and inhibition by foscarnet.

The enzymatic activity of wild type and mutant recombinant DNA polymerases and their inhibition by foscarnet (PFA) were evaluated by a filter-based assay described previously (1). Activated calf thymus DNA was used as a template and the enzymatic reaction was performed in 25 mM Tris-HCl (pH 8.0), 90 mM NaCl, 0.5 mM dithiothreitol, 5% glycerol, 1 μ M [3 H]-dCTP (specific activity, 42.5 Ci/mmol; PerkinElmer), increasing concentrations (0 to 5 μ M) of the other dNTPs (dATP, dGTP, and dTTP), 0.1 mg/ml activated calf thymus DNA (Amersham Biosciences) and 1 μ l of the enzyme-containing transcription-translation mixture adjusted to a total volume of 25 μ l with water. The amount of wild type and mutant DNA polymerases expressed by *in vitro* transcription/translation system using rabbit reticulocytes was estimated to be 1 ng/ml in previous studies (2) and the amount of proteins was not adjusted in the different assays. The reaction was started by the addition of 10 μ l MgCl₂ (10 mM final concentration) and mixtures were incubated at 37°C for 30 min and stopped by the addition of 600 μ l pre-chilled 5% trichloroacetic acid (TCA)–1% sodium pyrophosphate (NaPPi). Reaction tubes were maintained on ice for 10 min to precipitate the DNA and then filtered through a Millipore Multiscreen 1.2- μ m-pore-size glass fiber C 96-well filtration plate (EMD Millipore). Filters were then washed twice with 250 μ l of pre-chilled 5% TCA–1% NaPPi and with approximately 350 μ l of 99% ethanol. Inhibition of DNA polymerase activity by PFA was determined by adding in the reaction mixture described above an increasing concentration of PFA (0-2 μ M) in a total volume of 25 μ l. At the end of the reaction, filters were removed and placed into liquid scintillation vials to measure the radioactivity associated to the filters. We also determined the concentration that inhibits 50% of the DNA pol activity (IC₅₀) by using nine concentrations of PFA (0-2 μ M) whereas the concentration of each dATP, dTTP and dGTP was fixed at 0.3625 μ M.

References

1. **Tchesnokov EP, Gilbert C, Boivin G, Gotte M.** 2006. Role of helix P of the human cytomegalovirus DNA polymerase in resistance and hypersusceptibility to the antiviral drug foscarnet. *J Virol* **80**:1440-1450.
2. **Martin M, Azzi A, Lin S-X, Boivin G.** 2010. Opposite effect of two cytomegalovirus DNA polymerase mutations on replicative capacity and polymerase activity. *Antivir Ther* **15**:579-586.

Chapitre 4 : Effets différentiels de substitutions au codon 715 de la région II du domaine de la paume des ADN polymérases du VHS-1 et du CMV

4.1 Résumé

La substitution théorique V715S (région II, domaine de la paume) est associée à une résistance du CMV et du VHS-1 au FOS et au GCV/ACV, respectivement. Nous avons caractérisé les substitutions V715G/M déjà décrites dans la littérature et associées à différents phénotypes de sensibilités aux antiviraux. Bien que le VHS-1 recombinant V715G soit résistant au FOS et à l'ACV, nous avons montré que le CMV recombinant V715G ne se répliquait pas en culture cellulaire. La substitution V715M induit différents phénotypes pour les deux virus (FOS^R/GCV^S et FOS^S/ACV^R pour le CMV et le VHS-1, respectivement). Des tests d'inhibition de l'activité des ADN pol recombinantes mutantes par le FOS ont confirmé les différents profils de sensibilité au FOS des virus recombinants mutés. Les modèles tridimensionnels suggèrent que ces substitutions induiraient des changements au niveau de l'environnement hydrophobe de V715 influençant les phénotypes de sensibilité aux antiviraux et les capacités répliquatives des virus.

4.2 Abstract

The theoretical substitution V715S is associated to CMV and HSV-1 resistance to FOS. We also characterized the already known substitutions V715G/M that were associated to different drug susceptibility phenotypes. Although recombinant HSV-1 with substitution V715G was resistant to FOS and ACV, its CMV counterpart did not grow in cell culture. The substitution V715M induces different drug susceptibility phenotypes for the two viruses (FOS^R/GCV^S and FOS^S/ACV^R for CMV and HSV-1, respectively). Inhibition assays of the recombinant mutant DNA pol activity by FOS confirmed the different susceptibility profiles to FOS of the recombinant mutant viruses. The three-dimensional modeling analyses revealed that the introduction of these different mutations would induce changes on the usual hydrophobic environment of the valine at the position 715 that may influence the antiviral susceptibility of the viruses as well as their replicative capacity.

4.3 Article

Title Page

Differential Impact of Various Substitutions at Codon 715 in Region II of HSV-1 and HCMV DNA Polymerases

Running Title: Impact of substitutions at codon 715

Karima Zarrouk¹, Xiaojun Zhu², Nathalie Goyette¹, Jocelyne Piret¹, Rong Shi²
and Guy Boivin^{1,#}

¹, Research center in infectious diseases, CHU de Québec- Laval University, Quebec City, QC, Canada. ², Department of Biochemistry, Microbiology and Bioinformatics, PROTEO, and Institute of Integrative and Systems Biology, Laval University, Quebec City, QC, Canada

Abstract word count: 247

Text word count: 2,114

Figures: 2

Tables: 2

#, Correspondent footnote:

Dr Guy Boivin

Centre de recherche en infectiologie

CHU de Québec- Université Laval

2705, Blvd Laurier, R-0709

Québec (QC)

Canada, G1V 4G2

E-mail: Guy.Boivin@crchudequebec.ulaval.ca

Abstract

This study aimed at understanding the impact of different substitutions at codon 715 localized in the region II of the palm domain of herpes simplex virus 1 (HSV-1) and human cytomegalovirus (HCMV) DNA polymerases (pol). Here, we report a new theoretical mutation V715S that confers resistance of HSV-1 to foscarnet/acyclovir (5.6- and 9.2-fold increases EC_{50} values compared to wild type, respectively) and of HCMV to foscarnet/ganciclovir (2.8- and 2.9-fold increases in EC_{50} values compared to wild type, respectively). To further analyze the importance of this amino acid, we investigated the impact of the already known mutations V715M and V715G on the replicative capacities and drug susceptibilities of both viruses as well as on the activity and drug inhibition of the DNA pol. The V715G recombinant HSV-1 mutant was resistant to foscarnet and acyclovir (3.4- and 4.6-fold EC_{50} increase, respectively) whereas the V715M mutant was susceptible to foscarnet and resistant to acyclovir (3.4-fold EC_{50} increase). The V715G recombinant HCMV mutant did not grow and the V715M mutant was resistant to foscarnet (3.7-fold EC_{50} increase) and susceptible to ganciclovir. Finally, we showed by three-dimensional modeling that the differential impact of these mutations on the viral replicative capacity and drug resistance profile was related to different hydrophobic local environments for V715 in the DNA pol of the two viruses. Furthermore, we hypothesize that the DNA pol of HSV-1 is more tolerant to changes at this residue compared to that of HCMV because of a more hydrophobic environment stabilizing the region.

Keywords: Herpes simplex virus 1; human cytomegalovirus; antiviral drugs; resistance; DNA polymerases; molecular modeling

Highlights

- Substitutions at codon 715 in region II of HSV-1 and HCMV DNA polymerases differentially affects the replicative capacity.
- Substitutions at codon 715 in region II of HSV-1 and HCMV DNA polymerases differentially impact the drug susceptibility.
- Val715 in HSV-1 and HCMV DNA polymerases is surrounded by a different local environment.
- The more hydrophobic environment of Val715 in HSV-1 DNA polymerase may be more tolerant to substitutions at this position.

Herpes simplex virus 1 (HSV-1) and human cytomegalovirus (HCMV) are responsible for severe morbidity and mortality in immunocompromised patients (Munawwar and Singh, 2016; Roizman et al., 2013; Steininger, 2007). The guanosine analogues, acyclovir (ACV) and penciclovir, and their respective prodrugs, valacyclovir and famciclovir, are the first-line antiviral agents for the treatment of HSV-1 infections whereas ganciclovir (GCV) and its prodrug valganciclovir are indicated for HCMV infections. Second-line drugs consist in the pyrophosphate analogue, foscarnet (PFA), and the cytidine monophosphate analogue, cidofovir (CDV) (Andrei et al., 2009). The ultimate target of all these antivirals is the viral DNA polymerase (pol) encoded by the *UL30* gene (HSV-1) or *UL54* gene (HCMV) which is involved in viral DNA replication. To be active, ACV and GCV are first phosphorylated once by a viral kinase and then twice by cellular kinases, whereas CDV is phosphorylated only twice by cellular kinases. Finally, the viral DNA pol activity is slowed down and eventually blocked by the incorporation of the activated nucleoside analogues into elongating DNA. PFA blocks the viral DNA pol by directly binding to the enzyme and preventing the release of pyrophosphate during polymerization. However, long-term prophylaxis or treatment with these antivirals may lead to drug resistance and treatment failure (Lurain and Chou, 2010; Piret and Boivin, 2014).

During polymerization, the DNA pol of herpesviruses adopt either an open (binding of nucleotide) or close (polymerization reaction) conformation. It is suggested that PFA traps the DNA pol in its closed form (Zahn et al., 2011). By using a strategy based on sequences alignment of the DNA pol of herpesviruses and bacteriophages (Fig. 1A) that present different susceptibilities to PFA (Bennett and Gotte, 2013), we identified a theoretical mutation, V715S, located in conserved region II that conferred decreased susceptibility to PFA for both HSV-1 and HCMV recombinant viruses. Other mutations located at this position and resulting in various drug susceptibility profiles have been already described for HSV-1 (V715M/G) and HCMV (V715A/M) (Baldanti et al., 1996; Bestman-Smith and Boivin, 2003; Cihlar et al., 1998; Fischer et al., 2016; Saijo et al., 2002) suggesting an important role of this amino acid in the DNA pol activity. Here, we report on the impact of amino acid changes V715G/M/S on viral replicative capacity and drug susceptibility of recombinant HSV-1 and HCMV, DNA pol inhibition using enzymatic assays and molecular modeling approaches. In our study, the theoretical V715G mutation in *UL54* gene of HCMV was extrapolated by analogy with the already known mutation in HSV-1 (Saijo et al., 2002).

The complete genome of HSV-1 was split in overlapping cosmids and plasmids (Bestman-Smith and Boivin, 2003; Cunningham and Davison, 1993). For each mutation, two site-directed mutagenesis experiments were done to introduce selected V715G/M/S mutations into the *UL30* gene. Cosmids and plasmids were then co-transfected into Vero cells to reconstitute two independent clones

for each recombinant HSV-1 mutant. The entire *UL30* gene in plasmids and recombinant viruses was sequenced by Sanger sequencing and analyzed by using HSV-1 strain 17 (GenBank number: X14112.1) as a reference to verify that only the expected mutation was introduced.

Substitutions V715G/M/S were also introduced in the *UL54* gene of a bacmid using “en passant” mutagenesis (Drouot et al., 2013). The bacmid contains a bacterial artificial chromosome and the genome of HCMV strain AD169 in which we integrated the Gaussia luciferase (GLuc) reporter gene (described elsewhere (Drouot et al., 2013)). Two independent bacmids containing each substitution were generated and transfected in MRC-5 cells to produce two independent recombinant viruses. The entire *UL54* gene was sequenced by Sanger sequencing in all bacmids and recombinant viruses and analyzed by using HCMV strain AD169 (GenBank: X17403.1) as a reference.

Replicative capacities of wild type (WT) and the different recombinant HSV-1 mutants were determined in Vero cells (at a multiplicity of infection (MOI) = 0.001) for 3 days using real-time cell analysis (RTCA) (as described elsewhere (Piret et al., 2016)). Replicative capacities of WT and the different recombinant HCMV mutants were determined in MRC-5 cells (MOI = 0.001) by the GLuc reporter-based assay using cell culture supernatants collected daily for 8 days (as described elsewhere (Drouot et al., 2013)). The two clones of recombinant HCMV harboring the V715G mutation in the *UL54* gene did not grow (i.e., three different bacmid transfections were attempted without success for each of the two independent clones) and recombinant HSV-1 carrying this substitution had a marked defect in its replicative capacity (Fig. 1B). The V715M and V715S substitutions caused a decrease in the replicative capacities of recombinant HSV-1 (Fig. 1B), and especially of HCMV (Fig. 1C).

Drug susceptibilities of the WT and the different recombinant HSV-1 mutants were determined in Vero cells by plaque reduction assay (PRA). Vero cells infected with recombinant HSV-1 (MOI = 0.0001) were incubated with increasing concentrations of PFA [0-200 μ M (drug susceptible) or 0-800 μ M (drug resistant)] or acyclovir [0-0.5 μ M (drug susceptible) or 0-2 μ M (drug resistant)] (both from Sigma-Aldrich) in minimal essential medium (MEM) plus 2% fetal bovine serum (FBS) (both from Gibco/Invitrogen) containing 0.4% SeaPlaque agarose (Lonza) for 3 days. Drug susceptibilities of the WT and the different recombinant HCMV mutants were determined in MRC-5 cells using the GLuc reporter-based assay (Drouot et al., 2013). MRC-5 cells infected by recombinant HCMV (MOI = 0.001) were incubated with increasing concentrations of PFA [0-400 μ M (drug susceptible) or 0-800 μ M (drug resistant)] and GCV (0-64 μ M) (Sigma-Aldrich) in MEM plus 2% FBS. Cell culture supernatants were collected on day 6 post-infection to measure GLuc activity. The concentration of antiviral that reduced the number of plaques (HSV-1) or the GLuc activity (HCMV) by 50% compared to cells incubated without drug (EC_{50}) was calculated. The EC_{50}

values of PFA and ACV against the WT recombinant HSV-1 were $51 \pm 20 \mu\text{M}$ and $0.039 \pm 0.018 \mu\text{M}$, respectively (Table 1). The EC_{50} values of PFA against V715G/S mutants were 3.4- and 5.6-fold higher than that of WT (4.5- and 6.5-fold increase for the second clone) and were thus considered as drug resistant. Both clones of V715M mutant were susceptible to PFA. All three mutants V715G/M/S were considered resistant to ACV as they showed a significant increase in EC_{50} (4.6-, 3.4- and 9.2-fold compared to WT for the first clone and 10.2-, 3.7- and 4.9-fold for the second clone). The EC_{50} values of PFA and GCV against the WT recombinant HCMV were $28 \pm 7.1 \mu\text{M}$ and $2.1 \pm 1.2 \mu\text{M}$, respectively. The EC_{50} values of PFA against V715M/S HCMV mutants were 3.7- and 2.8-fold that of WT (3.8- and 2.0-fold for the second clone) and were thus considered as drug resistant. Both clones of V715M mutant were susceptible to GCV whereas the V715S mutant was resistant to this drug (2.9- and 3.0-fold increase compared to the WT for clones 1 and 2, respectively).

Mutations V715G/M/S were introduced in the *UL30* and *UL54* genes cloned into a pCITE4a plasmid (EMD BioScience) by site-directed mutagenesis (Martin et al., 2010). The entire *UL30/UL54* genes were sequenced to confirm that only the expected mutation was present. An *in vitro* transcription-translation system using reticulocyte lysates of rabbit (Promega Biosystems) was used to express all mutant proteins as previously described (Cihlar et al., 1997). The steady-state kinetics parameters [apparent maximal velocity ($V_{\text{max}(\text{app})}$) and Michaelis-Menten constant ($K_{\text{m}(\text{app})}$)] of WT and mutant DNA pol proteins and their inhibition by PFA [apparent inhibition constant ($K_{\text{i}(\text{app})}$)] were then determined by a filter-based assay (Martin et al., 2010; Tchesnokov et al., 2006). In accordance with the susceptibility of recombinant HSV-1 mutants to PFA, the $K_{\text{i}(\text{app})}$ values of V715G and V715S mutant proteins were respectively increased by 73.8- and 20.6-fold compared to the WT whereas the V715M mutant had a $K_{\text{i}(\text{app})}$ that was 2.4-fold that of the WT (Table 2). The $K_{\text{i}(\text{app})}$ values determined for the V715M and V715S mutant *UL54* proteins were 11.6- and 16.0-fold higher than that of WT as expected from the drug susceptibilities of recombinant HCMV. In accordance with the viral replicative capacities, the polymerase activity efficiencies (calculated as $V_{\text{max}(\text{app})}/K_{\text{m}(\text{app})}$) of V715G/M/S mutant *UL30* proteins based on the incorporation of radiolabeled dGTP were decreased (0.5, 14.6 and 13.6, respectively) compared to that of the WT (27.0) (Table 2). The polymerase activity efficiencies of the V715M/S mutant *UL54* proteins were also decreased (7.3 and 1.7, respectively) compared to that of the WT (9.0). The polymerase activity efficiency of the V715G mutant *UL54* protein was markedly decreased (0.2-fold) compared to that of WT and the recombinant HCMV harboring this mutation was unable to grow in cell culture. The fact that the recombinant HSV-1 with the equivalent mutation and the recombinant HCMV with V715S mutation were able to grow despite a severe reduction of their polymerase activity efficiency (0.02- and 0.2-fold those of their WT counterparts, respectively) suggests that factors other than the polymerase itself (for

instance, an altered interaction of the V715G DNA pol mutant with other viral proteins such as the processivity factor during the viral genome replication) may be implicated.

The V715 amino acid is located in the conserved region II of the palm domain, in the proximity of the catalytic center of UL30 and UL54 DNA pol (Fig. 2). Therefore, modification of this residue could bring about potential conformational changes that may significantly impact the activity of the DNA pol as well as its antiviral drug susceptibility. Due to the lack of crystal structure for UL54 and for the closed form model of UL30, we constructed the models of these proteins (as described elsewhere (Zarrouk et al., 2020)). In both UL30 and UL54 models (Fig. 2A/B), V715 is surrounded by a hydrophobic environment. In UL54, V715 establishes favorable van der Waals contacts with F915, F954 and the aliphatic portion of K952 (Fig. 2B). Mutating this valine residue to a serine residue will disrupt the local hydrophobic interactions and destabilize the overall structure of DNA pol, thus affecting the binding of PFA and GCV, particularly because this substitution could bring about drastic change to D717, a residue critical to anchor the magnesium ions and for the binding of PFA (Fig. 2C). Similarly, removal of the side chain at this position (V715G) will likely collapse the local structure as the conformations of both F915 and F954 could not be maintained and thus the UL54 DNA pol would lose its activity, rendering the mutant harboring G715 unable to grow. As V715 is snugly packed against F915 and F954, introducing a more bulkier side chain by the V715M substitution would also disturb the local environment and decrease the binding of PFA, consistent with the observed behavior of this mutant in UL54 DNA pol. In the case of UL30, the situation might be different from that of UL54 (Fig. 2A/B). Close inspection of these two DNA pol models reveals that there are many more bulky hydrophobic residues in the core of local structure in UL30 relative to UL54, exemplified by V714, W856, F859, M872, Y878, M880, M905, and M909 in the UL30 DNA pol and their corresponding residues A714, F856, P859, T892, V902, A904, R929 and L933 in the UL54 DNA pol. Moreover, in the vicinity of the immediate environment (F954/F930 in UL54/UL30, respectively) of V715, V969 and S976 in UL54 are replaced by more bulkier and hydrophobic I945 and L951 residues in UL30, respectively. In addition, two extra H-bonds are also observed at the surface in UL30 to further stabilize the local structure. On the other hand, the presence of charged residues such as E869 in the proximity of hydrophobic core in UL54 may contribute to the destabilization of its local structure upon mutation on V715.

The residue composition of the local environment of V715 in UL30 may provide much higher “buffering” capacity for this enzyme to accommodate the structural modifications on this residue. These differences likely render UL30 more compatible with the changes brought by the V715M and V715G mutations. This is likely the rationale why the V715M mutant does not lead to significant

difference in the susceptibility to PFA and the V715G mutant is still viable in UL30 but not in UL54. Thus, we showed that the valine at codon 715 is important for a correct activity of the DNA pol of both viruses probably because the palm domain is associated to the catalytic center of the enzyme and that all changes introduced at this codon impair (at different levels) the protein activity. Furthermore, we also observed a differential impact of these mutations on the antiviral drug susceptibilities of both viruses that are probably related to the different local environment of the V715 in UL30 and UL54 DNA pol. Overall, these results aim at improving our knowledge on the role of conserved region II of the DNA pol in the enzyme activity and drug inhibition and ultimately identify key residues that could be the targets of new antivirals.

Acknowledgments

This study was supported by a Foundation Grant from the Canadian Institutes of Health Research (grant no. 148361 to G.B.). The structural analysis was partially supported by a NSERC discovery grant (#436202) to R.S. G.B. is the holder of the Canada research chair on emerging viruses and antiviral resistance.

Data Policy

The datasets generated and analyzed during the current study are available from the corresponding author upon request.

Competing interests

The authors have no competing interest to declare.

References

- Andrei, G., de Clercq, E., Snoeck, R., 2009. Viral DNA polymerase inhibitors, in: Cameron, C.E., Gotte, M., Raney, K. (Eds.), *Viral genome replication*. Springer, New York, pp. 481-526.
- Baldanti, F., Underwood, M.R., Stanat, S.C., Biron, K.K., Chou, S., Sarasini, A., Silini, E., 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. *Journal of virology* 70, 1390-1395.
- Bennett, N., Gotte, M., 2013. Utility of the bacteriophage RB69 polymerase gp43 as a surrogate enzyme for herpesvirus orthologs. *Viruses* 5, 54-86.
- Bestman-Smith, J., Boivin, G., 2003. Drug resistance patterns of recombinant herpes simplex virus DNA polymerase mutants generated with a set of overlapping cosmids and plasmids. *Journal of virology* 77, 7820-7829.
- Cihlar, T., Fuller, M.D., Cherrington, J.M., 1997. Expression of the catalytic subunit (UL54) and the accessory protein (UL44) of human cytomegalovirus DNA polymerase in a coupled in vitro transcription/translation system. *Protein expression and purification* 11, 209-218.
- Cihlar, T., Fuller, M.D., Cherrington, J.M., 1998. Characterization of drug resistance-associated mutations in the human cytomegalovirus DNA polymerase gene by using recombinant mutant viruses generated from overlapping DNA fragments. *Journal of virology* 72, 5927-5936.
- Cunningham, C., Davison, A.J., 1993. A cosmid-based system for constructing mutants of herpes simplex virus type 1. *Virology* 197, 116-124.
- Drouot, E., Piret, J., Boivin, G., 2013. Novel method based on "en passant" mutagenesis coupled with a *Gussia* luciferase reporter assay for studying the combined effects of human cytomegalovirus mutations. *Journal of clinical microbiology* 51, 3216-3224.
- Fischer, L., Imrich, E., Sampaio, K.L., Hofmann, J., Jahn, G., Hamprecht, K., Gohring, K., 2016. Identification of resistance-associated HCMV UL97- and UL54-mutations and a UL97-polymorphism with impact on phenotypic drug-resistance. *Antiviral research* 131, 1-8.
- Lurain, N.S., Chou, S., 2010. Antiviral drug resistance of human cytomegalovirus. *Clinical microbiology reviews* 23, 689-712.
- Martin, M., Azzi, A., Lin, S.X., Boivin, G., 2010. Opposite effect of two cytomegalovirus DNA polymerase mutations on replicative capacity and polymerase activity. *Antiviral therapy* 15, 579-586.
- Munawwar, A., Singh, S., 2016. Human Herpesviruses as Copathogens of HIV Infection, Their Role in HIV Transmission, and Disease Progression. *J Lab Physicians* 8, 5-18.
- Piret, J., Boivin, G., 2014. Antiviral drug resistance in herpesviruses other than cytomegalovirus. *Reviews in medical virology* 24, 186-218.
- Piret, J., Goyette, N., Boivin, G., 2016. Novel Method Based on Real-Time Cell Analysis for Drug Susceptibility Testing of Herpes Simplex Virus and Human Cytomegalovirus. *Journal of clinical microbiology* 54, 2120-2127.
- Roizman, B., Knipe, D.M., Whitley, R.J., 2013. Herpes Simplex Viruses, in: Knipe, D.M., Howley, P.M. (Eds.), *Fields Virology*, Sixth ed. Lippincott Williams & Wilkins, Philadelphia, pp. 1823-1897.
- Saijo, M., Yasuda, Y., Yabe, H., Kato, S., Suzutani, T., De Clercq, E., Niikura, M., Maeda, A., Kurane, I., Morikawa, S., 2002. Bone marrow transplantation in a child with Wiskott-Aldrich syndrome latently infected with acyclovir-resistant (ACV(r)) herpes simplex virus type 1: emergence of foscarnet-resistant virus originating from the ACV(r) virus. *Journal of medical virology* 68, 99-104.
- Steininger, C., 2007. Clinical relevance of cytomegalovirus infection in patients with disorders of the immune system. *Clin Microbiol Infect* 13, 953-963.

- Tchesnokov, E.P., Gilbert, C., Boivin, G., Gotte, M., 2006. Role of helix P of the human cytomegalovirus DNA polymerase in resistance and hypersusceptibility to the antiviral drug foscarnet. *Journal of virology* 80, 1440-1450.
- Zahn, K.E., Tchesnokov, E.P., Gotte, M., Doublet, S., 2011. Phosphonoformic acid inhibits viral replication by trapping the closed form of the DNA polymerase. *The Journal of biological chemistry* 286, 25246-25255.
- Zarrouk, K., Pham, V.D., Piret, J., Shi, R., Boivin, G., 2020. Hypersusceptibility of Human Cytomegalovirus to Foscarnet Induced by Mutations in Helices K and P of the Viral DNA Polymerase. *Antimicrob Agents Chemother* 64 (4):e01910-19.

Figures

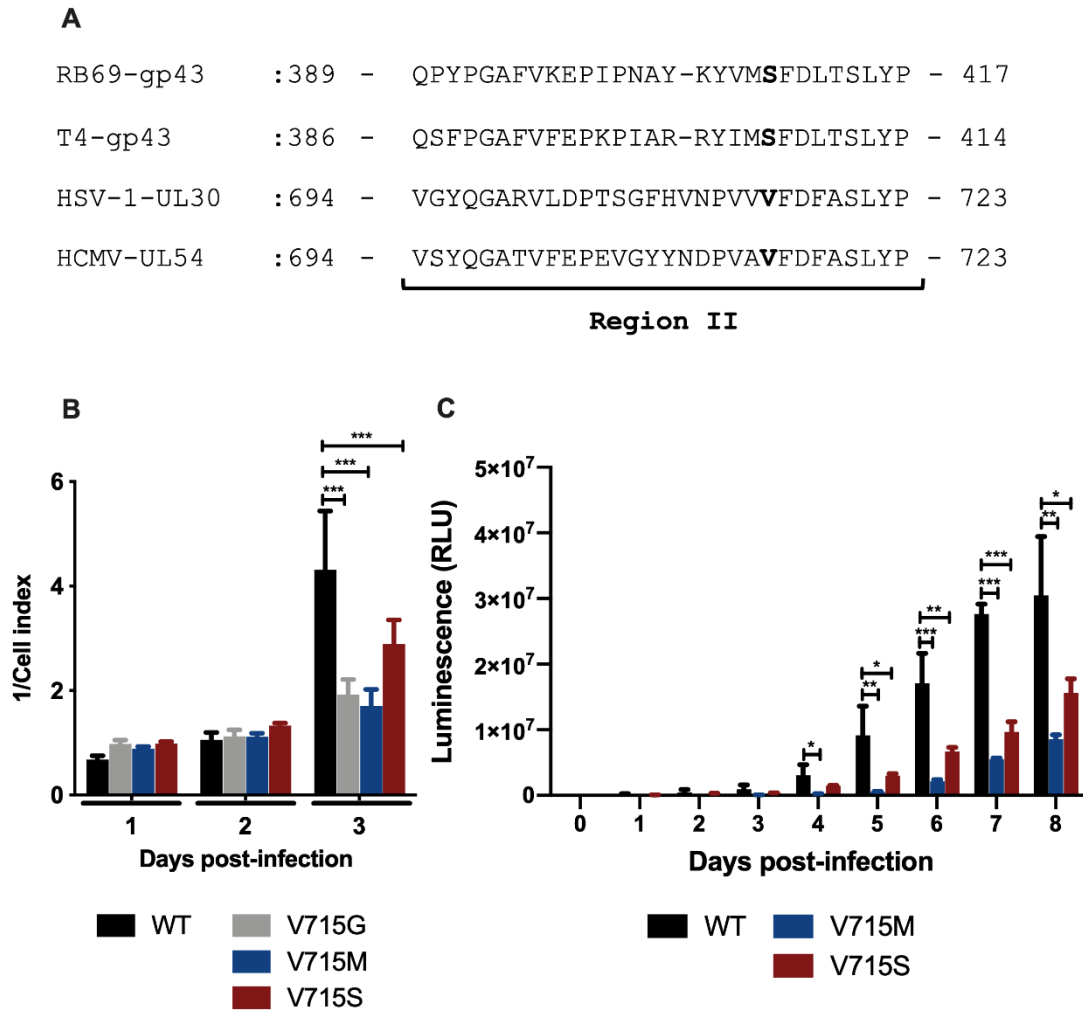


Fig. 1. (A) Sequences alignment of conserved region II of DNA pol of bacteriophages RB69 and T4 (gp43; both resistant to PFA) with DNA pol of herpes simplex virus 1 (HSV-1; UL30) and human cytomegalovirus (HCMV; UL54) (both susceptible to PFA). (B) Replicative capacity of wild type (WT) and recombinant HSV-1 harboring V715G/M/S mutations were determined in Vero cells for 3 days using real-time cell analysis (RTCA). Cells were infected with the different recombinant viruses at a MOI of 0.001. Data are represented as 1/cell index, a dimensionless parameter that reflects changes of cellular morphology or growth rate. (C) Replicative capacity of WT and recombinant HCMV carrying V715M/S mutations associated to PFA resistance. The Gaussia luciferase (GLuc) reporter-based assay was used to determine the replicative capacity of WT and mutant recombinant HCMV in MRC-5 cells. Cells were infected with the different recombinant viruses at a MOI of 0.001. Cell culture supernatants were collected daily for 8 days and the GLuc activity was measured. Data are expressed as relative light units (RLUs). Data represent the mean \pm SD of six replicates and are

representative of three independent experiments. A two-way analysis of variance (ANOVA) with Bonferroni post hoc test (GraphPad Prism, Version 8.3.0) was used to compare the viral replicative capacity of mutant viruses to those of the WT. *, $P < 0.05$; **, $P < 0.01$; ***, $P < 0.001$.

Table 1: Antiviral drug susceptibilities of wild type and recombinant HSV-1 and HCMV mutants.

Recombinant virus	EC ₅₀ values ± SD (fold change) § [n]	
	Foscarnet (µM)	Acyclovir (µM)
rvHSV-1 WT	51±20 (1) [n=23]	0.039±0.018 (1) [n=18]
rvHSV-1 V715G-1	176±70 (3.4) [n=3] ***	0.178±0.009 (4.6) [n=3] ***
rvHSV-1 V715M-1	75±16 (1.5) [n=3] ^{ns}	0.133±0.068 (3.4) [n=3] *
rvHSV-1 V715S-1	289±24 (5.6) [n=3] ***	0.357±0.118 (9.2) [n=3] ***
	Foscarnet (µM)	Ganciclovir (µM)
rvHCMV WT	28±7.1 (1) [n=18]	2.1±1.2 (1) [n=19]
rvHCMV V715M-1	105±32 (3.7) [n=5] ***	2.5±1.3 (1.2) [n=3] ^{ns}
rvHCMV V715S-1	78±14 (2.8) [n=4] ***	5.9±1.6 (2.9) [n=4] **

EC₅₀: effective concentration of antiviral that reduces by 50% the number of plaques (HSV-1) or the GLuc activity (HCMV) compared to cells incubated without drug for clone 1; rv: recombinant virus; WT: wild type. §, Fold change compared to the WT rvHSV-1 (derived from strain 17) or rvHCMV (derived from strain AD169). Results are the mean ± SD of three to twenty-three independent experiments [n]. A recombinant mutant virus is usually considered as resistant to a drug when its EC₅₀ value is ≥ 2-fold that of its WT counterpart. A one-way analysis of variance (ANOVA) with Dunnett post-test (GraphPad Prism, Version 8.00) was also used to compare EC₅₀ values of mutant viruses to those of the WT. *, P<0.05; **, P<0.01; ***, P< 0.001; ns, non-significant. EC₅₀ values that are statistically different from those of the WT were considered to induce drug resistance (shown in bold).

Table 2: Steady-state kinetics parameters of recombinant wild type and mutant DNA pol proteins and inhibition of enzymatic activity by foscarnet.

Recombinant proteins	<u>Steady-state kinetics parameters</u>				<u>Inhibition by foscarnet</u>	
	$V_{\max (app)}$ (fmol/min)	$K_{m(app)}$ (μ M)	$V_{\max (app)}/$ $K_{m(app)}$	Fold change	$K_i (app)$ (μ M)	Fold change
UL30-WT	26.39 \pm 1.6	0.98 \pm 0.27	27.04	1.00	0.22 \pm 0.07	1.00
UL30-V715G	0.91 \pm 0.23	1.56 \pm 0.65	0.51	0.02	15.88 \pm 1.07	73.75
UL30-V715M	14.6 \pm 2.6	1.00 \pm 0.22	14.57	0.54	0.52 \pm 0.16	2.41
UL30-V715S	43.97 \pm 4.62	3.24 \pm 1.30	13.56	0.50	4.44 \pm 2.81	20.62
UL54-WT	5.41 \pm 2.47	0.60 \pm 0.16	8.98	1.00	0.25 \pm 0.04	1.00
UL54-V715M	20.86 \pm 3.87	2.87 \pm 1.05	7.32	0.81	2.87 \pm 1.00	11.6
UL54-V715S	1.32 \pm 0.56	0.76 \pm 0.28	1.74	0.19	3.96 \pm 1.56	16

Results represent the mean \pm SD of 3 independent experiments; WT: Wild type; $V_{\max(\text{app})}$: Apparent maximum velocity, $K_{\text{m}(\text{app})}$: Apparent Michaelis-Menten constant, $K_{\text{i}(\text{app})}$: Apparent constant of inhibition.

Fold changes of $V_{\max(\text{app})}/K_{\text{m}(\text{app})}$ and $K_{\text{i}(\text{app})}$ compared to WT values. The average observed rates of enzymatic activity *versus* substrate concentrations data (in the absence and presence of foscarnet) were fitted simultaneously according to nonlinear equation for non-competitive inhibition to calculate the apparent constant of inhibition (K_{i}) value by the use of GraphPad Prism[®] software.

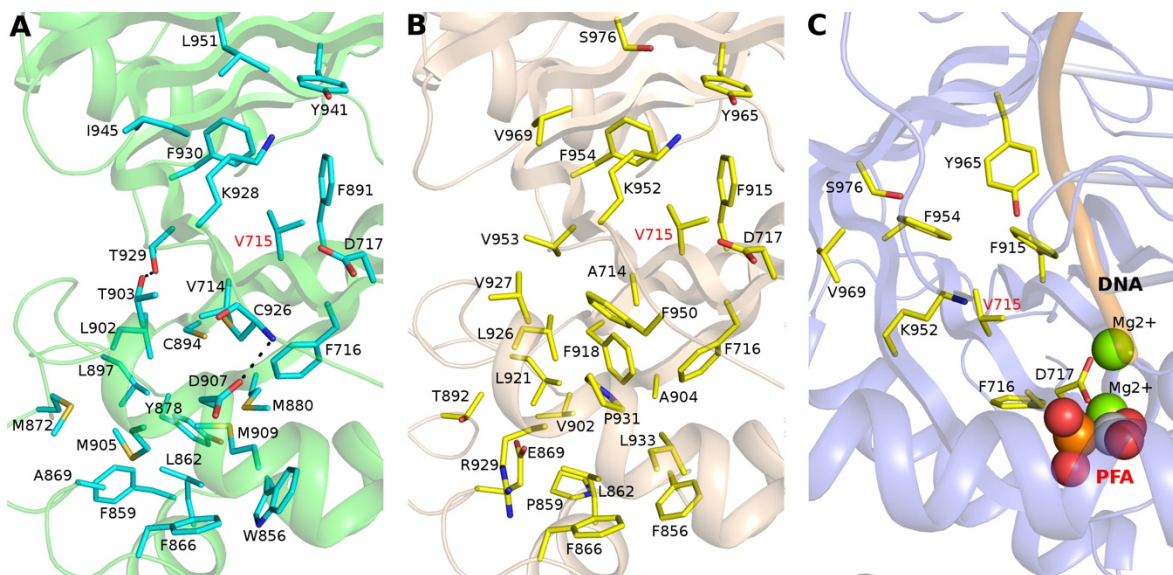


Fig. 2. (A) Crystal structure of UL30 DNA pol (open form, PDB 2GV9). The V715 amino acid establishes many hydrophobic interactions with its surrounding residues. The local secondary structure is fortified by numerous bulky and hydrophobic residues in the core as well as additional H-bonds at the surface involving C926 (with D907) and T929 (with T903). The H-bonds are shown as black dashed lines. (B) The model of UL54 DNA pol obtained from the crystal structure of UL30 DNA pol. Many hydrophobic residues, although less bulkier than those in UL30, contribute to the stabilization of the local structure. The charged residues E869 and R929 are at the edge of this local environment. (C) The model of UL54 DNA pol (closed form, obtained from the starting PDB 3IAY). The model of UL30 DNA pol in this region is similar and omitted here for clarity. The DNA molecule, foscarnet (PFA, represented by spheres colored in orange, purple and red for the phosphate, carbon and oxygen atoms, respectively), and magnesium ions (Mg^{2+} , shown in green spheres) from the crystal structure of RB69 DNA pol bound with DNA and PFA (PDB 3KD5) are superposed onto the model. D717 is presumably important to anchor the Mg^{2+} ions. All the residues are shown in stick mode.

Chapitre 5 : Discussion

« *Cytomegalovirus: where have we been and where are we going?* » (Merigan T.C.; 1990)[207]

La plupart des virus herpétiques sont aujourd'hui considérés comme des virus communs et présentant une répartition mondiale. Dans la majorité des cas, ces virus induisent des infections asymptomatiques ou des symptômes légers ainsi que d'autres manifestations cliniques plus graves comme des infections congénitales associées au CMV ou à l'herpès néonatal. Cependant, il en est tout autre pour les personnes immunosupprimées qui ont des symptômes sévères et disséminés suite à une infection par le CMV ou le VHS-1 pouvant conduire au décès du patient, tel que présenté dans l'introduction. Des traitements antiviraux sont administrés à ces patients sur une longue période de temps. L'émergence de souches virales résistantes à l'un ou plusieurs de ces antiviraux peut donc être observée. De nos jours, la résistance aux antiviraux est, de manière générale, un enjeu important dans la lutte contre les infections virales. La prophylaxie et les traitements à long terme sont des éléments importants dans l'apparition de mutations conférant une résistance à un antiviral. Le foscarnet est un antiviral de seconde ligne qui agit directement sur l'ADN pol du CMV et du VHS-1 sans avoir besoin de phosphorylation pour être actif. Malheureusement, il est très néphrotoxique et est disponible seulement sous forme intraveineuse. Ainsi, peu de mutations conférant une résistance du CMV et du VHS-1 au FOS ont été caractérisées par rapport aux mutations associées à une résistance aux analogues de nucléosides (GCV/ACV) qui font parties des traitements de première ligne. Nous avons donc décidé de nous intéresser aux mécanismes de résistance du CMV et du VHS-1 au FOS associés à des mutations dans les gènes qui codent pour leur ADN pol UL54 et UL30, respectivement. Ce chapitre permet de faire un bilan de nos connaissances concernant les mécanismes de résistance du CMV et du VHS-1 aux antiviraux, ce que les résultats obtenus au cours de ma thèse apportent et ce qu'il reste encore à caractériser et éclaircir.

Mécanismes de résistance du CMV et du VHS-1 au FOS

Au cours de ma thèse, j'ai abordé les mécanismes de résistance des virus herpétiques (CMV et VHS-1) au FOS. Les études que nous avons menées visaient à étudier deux domaines (NH₂-terminal et paume) de l'ADN pol qui semblaient être impliqués dans les sensibilités de ces virus au FOS mais pour lesquels les mécanismes de résistance n'étaient pas encore clairement établis. Pour

rappel, les ADN pol des virus herpétiques possèdent six domaines conservés (pré-NH₂-terminal, NH₂-terminal, exonucléase, paume, doigts et pouce), qui ensemble forment schématiquement une main droite. Bien que chacun soit impliqué dans des fonctions plus ou moins distinctes, tous les domaines des ADN pol sont importants pour maintenir la structure de la protéine et le bon déroulement des changements de conformation qui ont lieu lors de la réaction de polymérisation. Par exemple, au cours de cette réaction, le domaine des doigts se déplace vers le domaine NH₂-terminal qui contient l'hélice K (conformation ouverte) ou vers le domaine de la paume dont fait partie la région II (conformation fermée). Le FOS interagirait avec deux acides aminés du domaine des doigts conservés entre les ADN pol du bactériophage RB69 [R482 (hélice N) et K560 (hélice P)], du CMV [R784 (hélice N) et K811 (hélice P)] et du VHS-1 [R785 (hélice N) et K811 (hélice P)] [188]. Le rôle des changements de conformation impliquant le domaine des doigts (hélices N et P) dans la réaction de polymérisation de l'ADN pol ainsi que l'impact des mutations localisées dans ce domaine sur la résistance du CMV et du VHS-1 au FOS ont été étudiés précédemment [139, 187]. En 2011, Zahn *et al* ont suggéré que le FOS aurait une meilleure affinité pour l'ADN pol du bactériophage RB69 chimérique (*i.e.*, possédant des acides aminés clés de l'ADN pol du CMV la rendant sensible au FOS) quand elle est dans sa conformation fermée [188]. Des substitutions dans les hélices N (W781V/W780V de UL54/UL30) et P (L802M et A809V de UL54) conférant une résistance du CMV et du VHS-1 au FOS favoriseraient une conformation plus ouverte de l'ADN pol à laquelle l'antiviral se lie avec moins d'affinité [187, 188].

L'implication des domaines NH₂-terminal et de la paume, qui interagissent avec celui des doigts, dans la résistance du CMV et du VHS-1 au FOS a été peu étudiée. Nos résultats ont montré que des mutations dans le domaine NH₂-terminal pouvaient conférer une hypersensibilité (Q579I dans UL54 avec une moyenne des CE₅₀ de 0,12-fois celle du virus sauvage) ou une résistance au FOS (I619K dans UL30 avec une moyenne des CE₅₀ de 2,5-fois celle du virus sauvage). Ceci confirme que l'hélice K qui interagit avec le domaine des doigts est impliquée indirectement dans la sensibilité du CMV et du VHS-1 au FOS. En effet, ces substitutions modifient l'environnement local du domaine NH₂-terminal, et par conséquent, une bonne conformation de la protéine. D'une part, nous avons observé que l'hypersensibilité au FOS associée à la substitution Q579I dans UL54 serait la conséquence d'une conformation plus fermée de la protéine pour laquelle l'antiviral a une meilleure affinité (Chapitre 3). D'autre part, nous avons montré que la résistance au FOS associée à la substitution I619K dans UL30 modifiait également la conformation de l'ADN pol qui était plus ouverte, et qui avait par conséquent, une moins bonne affinité pour l'antiviral (Chapitre 2).

Il a déjà été montré que la région II jouait un rôle dans la sensibilité des virus herpétiques au FOS puisque des substitutions localisées dans cette région ont été associées à une résistance du CMV (T700A, V715A/M et I726V) et du VHS-1 (R700G, V715G, A719V et S724N) à cet antiviral [178, 181, 186]. Nos travaux ont confirmé que cette région est importante puisque les substitutions Q697P/V715S/A719T dans UL54 (moyenne des CE_{50} de 3,8-, 2,8- et 2,5-fois celle du virus sauvage, respectivement) et V715S/A719T dans UL30 (moyenne des CE_{50} de 5,6- et 2-fois celle du virus sauvage, respectivement) sont associées à une résistance au FOS. Nous avons constaté que la résistance au FOS induite par ces substitutions est associée à un changement de l'environnement local de la région II qui induit une déstabilisation de la protéine dans sa conformation fermée et favorise une conformation ouverte pour laquelle l'antiviral a une plus faible affinité.

La représentation schématique de la localisation des mutations cliniques et théoriques conférant la résistance au FOS au niveau de l'ADN pol pourrait permettre d'avoir une vision d'ensemble et de mieux délimiter les régions impliquées dans la sensibilité de la protéine à cet antiviral. La figure 29 est une représentation de l'ADN pol UL30 dans sa conformation ouverte sur laquelle sont indiqués les acides aminés dont les mutations cliniques et théoriques confèrent une résistance du VHS-1 au FOS. Cette figure nous montre que les mutations qui confèrent une résistance au FOS sont en majorité présentes dans le domaine de la paume et des doigts et qu'un petit nombre d'entre elles sont distribuées dans le domaine du pouce et de l'hélice K du domaine NH_2 -terminal. Toutes ces mutations semblent faire face au centre de l'enzyme où se lie l'ADN et également dans les régions interagissant avec le domaine des doigts comme l'hélice K.

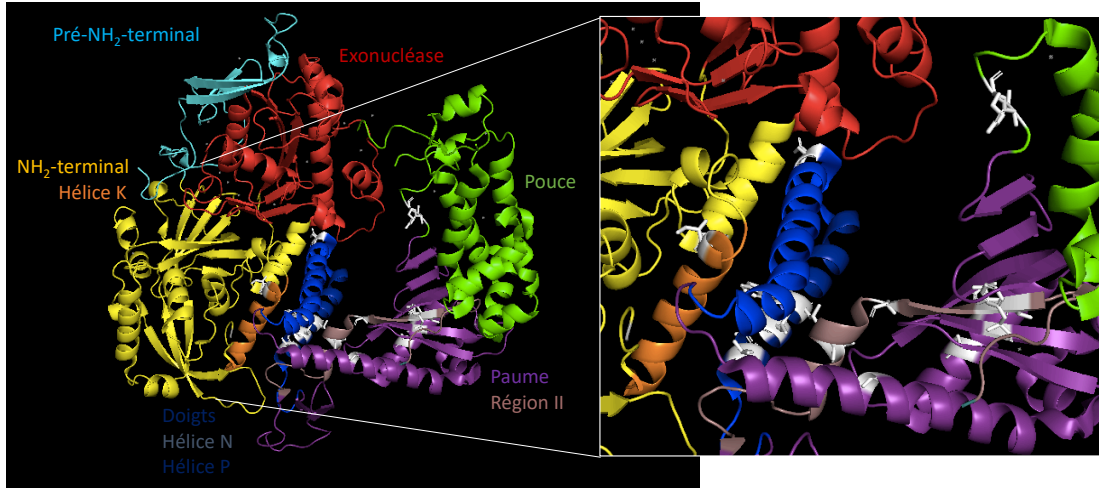


Figure 29 : Localisation sur l'ADN pol UL30 des acides aminés dont les mutations confèrent une résistance du VHS-1 au FOS.

Représentation d'UL30 dans sa conformation ouverte (PDB 2GV9) qui montre les différents domaines de l'ADN pol : en bleu cyan, le domaine pré-NH₂-terminal, en jaune, le domaine NH₂-terminal avec en orange l'hélice K, en rouge, le domaine exonucléase, en vert, le pouce, en violet, la paume dont la région II est en rose, et en bleu, le domaine des doigts avec en bleu clair l'hélice N et en bleu foncé l'hélice P. Les acides aminés associés à une résistance du VHS-1 au FOS lorsqu'ils sont mutés sont représentés en blanc. Les mutations sélectionnées sont celles rapportées dans la littérature et celles étudiées au cours de ma thèse (Tableau 7A) [183]. Figure réalisée à l'aide du logiciel PyMOL (version 2.3).

Nous avons également constaté une diminution des capacités répliquatives des CMV et VHS-1 recombinants possédant les substitutions Q697P, V715S, V715M et A719T (région II) et dans UL54 (0,58-, 0,28-, 0,51- et 0,72-fois celle des virus recombinants sauvages au jour 8 post-infection, respectivement) et I619K (hélice K), V715S, V715G et A719T (région II) dans UL30 (0,51-, 0,67-, 0,44- et 0,68-fois celle des virus recombinants sauvages au jour 3 post-infection, respectivement) et conférant une résistance au FOS. Une diminution des capacités répliquatives a également été observée chez des CMV recombinants possédant les substitutions Q579I (hélice K) et K805Q (hélice P) associées à une hypersensibilité au FOS (0,12- et 0,34-fois celle du virus sauvage au jour 8 post-infection, respectivement). Le lien entre la diminution de la capacité répliquative des virus et les mutations conférant une résistance à un antiviral est également décrit dans la littérature [187, 205, 208, 209]. En effet, les mutations étant localisées au niveau de l'ADN pol des virus, les mécanismes généralement privilégiés reposent sur une diminution de l'activité de polymérisation causée par la mutation. Ainsi, il a été proposé que certaines mutations pourraient affecter le processus de polymérisation en diminuant l'affinité de l'ADN pol virale pour les dNTP

[178, 209]. Les mutations pourraient donc affecter l'activité de polymérisation à plusieurs niveaux; liaison des dNTP, leur incorporation dans l'ADN en cours d'élongation mais également affecter la liaison de l'ADN à l'ADN pol virale. En effet, une mutation qui confère une résistance à un antiviral est en majorité associée à un coût pour le virus qui peut s'exprimer par une diminution de sa capacité répliquative.

D'un point de vue un peu plus général, chaque mutation associée à une résistance au FOS semble avoir sa propre signature. Nous avons étudié quatre paramètres pour chaque mutation : la sensibilité des virus recombinants mutants aux antiviraux, la capacité répliquative des virus ainsi que l'impact de la mutation sur l'ADN pol (inhibition par le FOS et activité de polymérisation) et sur la conformation tridimensionnelle de la protéine. Ainsi, chaque mutation peut avoir une influence différente sur ces paramètres et partager le même phénotype de sensibilité aux antiviraux. Certaines substitutions (Q697P, V715S et A719T dans UL54 et I619K, V715S et A719T dans UL30) que nous avons étudiées ont permis de valider, à l'aide de la modélisation moléculaire, l'hypothèse selon laquelle la résistance au FOS serait induite par une conformation plus ouverte de la protéine à laquelle l'antiviral se lie avec une plus faible affinité. Quelle rationnelle pouvons-nous utiliser pour expliquer les degrés de résistance? Plus une protéine aura une conformation ouverte plus elle sera résistante au FOS et moins le virus se répliquera? Les réponses à ces questions ne sont pas si simples car beaucoup de paramètres doivent être pris en compte. Une explication plausible reposerait sur la stabilité de l'ADN pol, les mutations conférant une résistance au FOS serait dues à une conformation plus ouverte de la protéine, ce qui la déstabiliserait, diminuerait son activité enzymatique, et par conséquent, la capacité répliquative du virus. Nous faisons souvent le lien entre la capacité répliquative du virus et l'activité de polymérisation de l'ADN pol. Il serait intéressant de vérifier si ce lien est direct, c'est-à-dire que l'impact de la mutation sur la protéine serait si important que cela ralentirait l'élongation de l'ADN viral ou s'il s'agit, au contraire, d'un effet indirect. Par exemple, une mutation qui induirait un changement de conformation de la protéine pourrait diminuer l'interaction de l'ADN pol avec d'autres protéines virales ou cellulaires qui interviendraient lors de la répllication virale. Cela a été observé dans des études qui visaient à comprendre le rôle du domaine pré-NH₂-terminal qui a été mis en évidence en 2006 suite à la cristallisation de l'ADN pol UL30 du VHS-1 [203]. Le domaine pré-NH₂-terminal serait important pour l'interaction avec d'autres protéines virales ou cellulaires (encore indéterminées) au cours de la répllication de l'ADN viral [210, 211]. Ainsi, il serait intéressant de comparer par immunobuvardage l'expression de la protéine mutée par rapport à la protéine sauvage. On pourrait également vérifier, par immunoprécipitation, si les protéines sont capables de maintenir une

interaction avec leur facteur de processivité (UL44/UL42 du CMV/VHS-1, respectivement) ainsi qu'avec les protéines impliquées dans la réplication virale (IE2-p86/UL105/UL70/UL102 du CMV et UL9/ICP8/UL5/UL8/UL52 du VHS-1) (Annexe A).

Au cours de ma thèse, je me suis en grande partie concentrée sur les mutations de l'ADN pol qui confèrent une résistance du CMV et du VHS-1 au FOS mais nous avons également identifié des mutations qui conféraient une résistance aux analogues de nucléosides (GCV et ACV).

Mécanismes de résistance du CMV et du VHS-1 aux analogues de nucléosides

Certaines substitutions que nous avons identifiées ou caractérisées au cours de nos recherches confèrent également une résistance au GCV (V715S et A719T avec une moyenne des CE_{50} de 2,9- et 2,4-fois celle du virus sauvage, respectivement) ou à l'ACV (I619K, V715G, V715S, V715M et A719T avec une moyenne des CE_{50} de 2,1-, 4,6-, 9,2-, 3,4- et 3,5-fois celle du virus sauvage, respectivement). Dépendamment de la mutation, l'impact sur les paramètres de l'activité enzymatique est différent et il est difficile de conclure à un profil précis en fonction de la localisation de la mutation au niveau de la protéine. Cependant, des études ont déjà suggéré des hypothèses pour expliquer la résistance aux analogues de nucléosides. La première étant que l'ADN pol lierait ou incorporerait moins bien l'antiviral [185, 212]. Certaines suggèrent que l'excision de l'antiviral serait augmentée [186], alors que d'autres iraient dans le sens d'une diminution de l'excision de l'antiviral, ce qui permettrait d'augmenter la polymérisation de l'ADN viral [209, 212]. Évidemment, il est fort probable que ces trois mécanismes puissent être utilisés dépendamment de la mutation et de sa localisation. Ces hypothèses découlent de résultats obtenus à partir de mutations localisées dans le domaine exonucléase de l'ADN pol. Peu d'études ont analysé l'impact de mutations conférant une résistance aux analogues de nucléosides et localisées dans des domaines de l'ADN pol autre que celui de l'exonucléase. Au cours de mon doctorat, nous nous sommes concentrés sur la résistance au FOS. Cependant, il serait intéressant de poursuivre la caractérisation des mutations identifiées et associées à une résistance au GCV ou à l'ACV. En effet, l'activité exonucléase des protéines mutées et leur inhibition pourraient être étudiées avec du [32 P]-GCV (triphosphorylé) ou du [32 P]-ACV (triphosphorylé) en évaluant leur incorporation dans l'ADN en élongation à l'aide de gels de polyacrylamide. Afin d'affiner les mécanismes de résistance aux analogues nucléosidiques, il faudrait également étudier l'activité exonucléase ainsi que leur activité de polymérisation et réaliser des tests d'inhibition au GCV/ACV afin de caractériser des substitutions qui confèrent une résistance aux analogues de nucléosides uniquement

(par exemple, A789G dans UL54 et Y941H dans UL30) et localisées dans un domaine de l'ADN pol autre que celui de l'exonucléase.

Ces deux premières parties avaient pour but de discuter des mécanismes de résistance du CMV et du VHS-1 que ce soit au FOS ou aux analogues de nucléosides (GCV et ACV). Le prochain point aborde des résultats inattendus mais qui ont permis d'élargir notre vision concernant l'importance d'étudier les différents phénotypes de sensibilités aux antiviraux ainsi que l'identification d'acides aminés clés pour l'ADN pol.

Apport de l'étude des différents phénotypes de sensibilité aux antiviraux et des acides aminés clés

Lors de la génération de nos virus recombinants contenant des substitutions théoriques, nous avons obtenu un phénotype inattendu comme une hypersensibilité au FOS chez un CMV possédant la substitution Q579I (moyenne des CE_{50} de 0,12-fois celle du virus sauvage) localisée dans l'hélice K du domaine NH_2 -terminal (Chapitre 3). Dans le cadre de la caractérisation de ce mutant, nous avons sélectionné la mutation K805Q dans l'ADN pol UL54 (CMV) qui était déjà rapportée dans la littérature comme associée à une augmentation de la sensibilité du virus au FOS (moyenne des CE_{50} de 0,19-fois celle du virus sauvage) [139]. Le résidu K805 est localisé au niveau de l'hélice P du domaine des doigts qui est composé de résidus très conservés entre les ADN pol des virus herpétiques et celle du bactériophage RB69, et est impliquée dans l'interaction avec le brin matrice et les dNTP [139]. La substitution équivalente K805Q dans UL30 du VHS-1 présente également une augmentation de la sensibilité au FOS [195]. Ainsi, les mutations qui confèrent une hypersensibilité du CMV et du VHS-1 au FOS peuvent également être localisées dans différents domaines des ADN pol (doigts, NH_2 -terminal). De plus, ce projet nous a permis, à l'aide du phénotype opposé, d'appuyer l'hypothèse que la résistance du CMV au FOS serait liée à une conformation plus ouverte de l'ADN pol. En effet, la substitution Q579I stabiliserait la protéine dans sa conformation fermée pour laquelle le FOS a une affinité plus élevée. Ce phénotype d'hypersensibilité au FOS n'est pas unique aux virus herpétiques. Par exemple, des mutations de la reverse transcriptase du VIH ont été associées à une hypersensibilité au FOS et/ou aux analogues de nucléosides [213].

L'introduction de mutations théoriques dans les gènes codant pour les ADN pol du CMV et du VHS-1 nous a également permis d'identifier des codons clés pour les activités de ces enzymes et leurs structures. En effet, nous avons constaté que le changement d'un seul acide aminé à une position précise pouvait avoir pour conséquence l'incapacité des virus recombinants de se répliquer

et donc de croître en culture cellulaire (Tableau 8) [214]. Les substitutions en gras dans les tableaux 8A et 8B sont celles que nous avons caractérisées au cours de mon doctorat. Un point d'autant plus intéressant était l'existence d'autres substitutions à ces codons qui étaient associées à une résistance à un ou plusieurs antiviraux. Par exemple, la substitution Q578P du CMV était associée à un défaut de croissance en culture cellulaire alors que les substitutions Q578H/L ont été détectées en cliniques et sont associées à des phénotypes de sensibilités différentiels aux antiviraux (FOS^R/GCV^R/CDV^R et FOS^R/GCV^S/CDV^S associés aux substitutions Q578H et Q578L, respectivement) [214, 215]. Ces acides aminés sont donc importants pour la sensibilité du CMV aux antiviraux mais semble l'être également pour l'activité enzymatique et/ou la structure des protéines (Chapitre 2)[214].

Tableau 8 : Substitutions dans les gènes *UL54* (CMV) (A) et *UL30* (VHS-1) (B) associées à un défaut de croissance en culture cellulaire.

Tableaux réalisés à partir de la littérature [214] et ceux obtenus au cours de ma thèse.

A	Mutations CMV	Domaines conservés	B	Mutations VHS-1	Domaines conservés
	E235G	NH ₂ -terminal		Q617P	NH ₂ -terminal (hélice K)
	Y380C	Exonucléase		R620T	NH ₂ -terminal (hélice K)
	V482G	Exonucléase		L626F	NH ₂ -terminal (hélice K)
	Q578P	NH ₂ -terminal (hélice K)		F718L	Paume (région II)
	R581H/T	NH ₂ -terminal (hélice K)			
	L587F	NH ₂ -terminal (hélice K)			
	P712Y	Paume (région II)			
	V715G	Paume (région II)			
	F718L/S	Paume (région II)			
	G822D	Doigts (hélice P)			
	M828V	Paume			

Les régions étudiées des ADN pol (hélice K du domaine NH₂-terminal et région II de la paume) sont conservées et les acides aminés qui les composent sont importants pour une conformation adéquate de l'enzyme afin de pouvoir effectuer les différentes activités enzymatiques qui lui incombent. L'ADN pol du CMV et du VHS-1 possèdent plusieurs activités : 5'-3' polymérase dont le site actif se trouve au niveau du domaine de la paume; le domaine de l'exonucléase possède le site actif de l'activité 3'-5' exonucléase; et une activité 5'-3' RNase H qui dégrade les duplex ADN ou les hétéroduplexes ADN-ARN.

Nous avons montré que l'hélice K possède des acides aminés clés pour la réplication virale. En effet, nous avons identifié quatre substitutions associées à un défaut de croissance du CMV et du VHS-1 en culture cellulaire (Q578P/Q617P, R581T/R620T, L587F/L626F de UL54/UL30). Dans le chapitre 2, nous montrons que ces défauts de croissance des virus recombinants mutants sont associés à des modifications de l'interaction avec l'hélice P du domaine des doigts ou à des impacts sur la structure locale de la protéine, ce qui entraînerait une perte d'activité de l'ADN pol virale. Cependant, comme nous avons pu le constater avec la substitution V715G dans UL54 (CMV), un défaut de croissance en culture cellulaire peut malgré tout s'accompagner d'une activité de polymérisation bien que celle-ci soit fortement diminuée (0,2-fois celle de la protéine UL54 sauvage). Nous avons émis l'hypothèse que cela pourrait être lié au fait que, dans les tests enzymatiques, seule l'ADN pol virale était utilisée alors que dans le contexte de la culture cellulaire toutes les protéines virales et cellulaires participant à la réplication virale sont présentes. Il serait intéressant d'effectuer ces tests enzymatiques avec le complexe ADN pol/facteur de processivité et d'analyser l'activité de polymérisation des ADN pol recombinantes mutées en comparaison avec les enzymes sauvages. De plus, comme suggéré précédemment dans la discussion et afin de poursuivre ce projet il faudrait analyser l'interaction des ADN pol virales possédant ces mutations avec les différentes protéines impliquées dans la réplication virale et de comparer ces interactions avec celles de l'ADN pol sauvage. Concernant la substitution L587F/L626F de UL54/UL30, nous avons suggéré que cette substitution pourrait perturber la structure du domaine NH₂-terminal et ainsi les changements de conformation de l'enzyme nécessaire à son activité. De plus, cet acide aminé fait face à une autre région du domaine NH₂-terminal qui semblerait être le site actif d'une des activités de l'ADN pol mais qui reste, à ce jour, indéterminée. Il a été suggéré que l'activité 5'-3' RNase H de l'ADN pol virale aurait son site actif au sein du domaine NH₂-terminal puisque le motif $\beta\alpha\beta\beta\alpha\beta$ qui est un motif RRM (« *RNA recognition motif* ») a été identifié au sein de ce domaine [203, 216]. Le domaine NH₂-terminal possède trois motifs : le premier représenté en vert sur la figure 29 (motif 1), le motif $\beta\alpha\beta\beta\alpha\beta$ et le dernier motif qui est composé de deux hélices dont l'hélice K (Figure 29) [203, 217]. Ces trois motifs formeraient un site actif qui impliquerait la liaison de l'ARN. Une étude récente a démontré que l'activité RNase H du VHS-1 serait dépendante du site actif de l'activité exonucléase et ne serait pas localisée dans le domaine NH₂-terminal [218]. Cependant, ce domaine pourrait être la clé de nombreuses zones floues concernant la réplication du CMV et du VHS-1. La réplication en cercle roulant est l'hypothèse privilégiée pour expliquer la réplication virale de ces virus, mais cela n'est pas certain et le passage de la forme theta au cercle roulant n'est pas non plus déterminé. Ainsi, l'hélice K est importante car elle se trouve à la frontière entre le domaine des doigts, essentiel à la polymérisation de l'ADN viral, et cette poche au sein du domaine

NH₂-terminal qui possède probablement une activité cruciale pour l'ADN pol impliquant la liaison d'ARN qui pourrait être des amorces ARN. Ainsi, la substitution L587F/L626F de UL54/UL30 pourrait avoir un impact délétère pour cette activité non déterminée, ce qui empêcherait la réplication du génome viral.

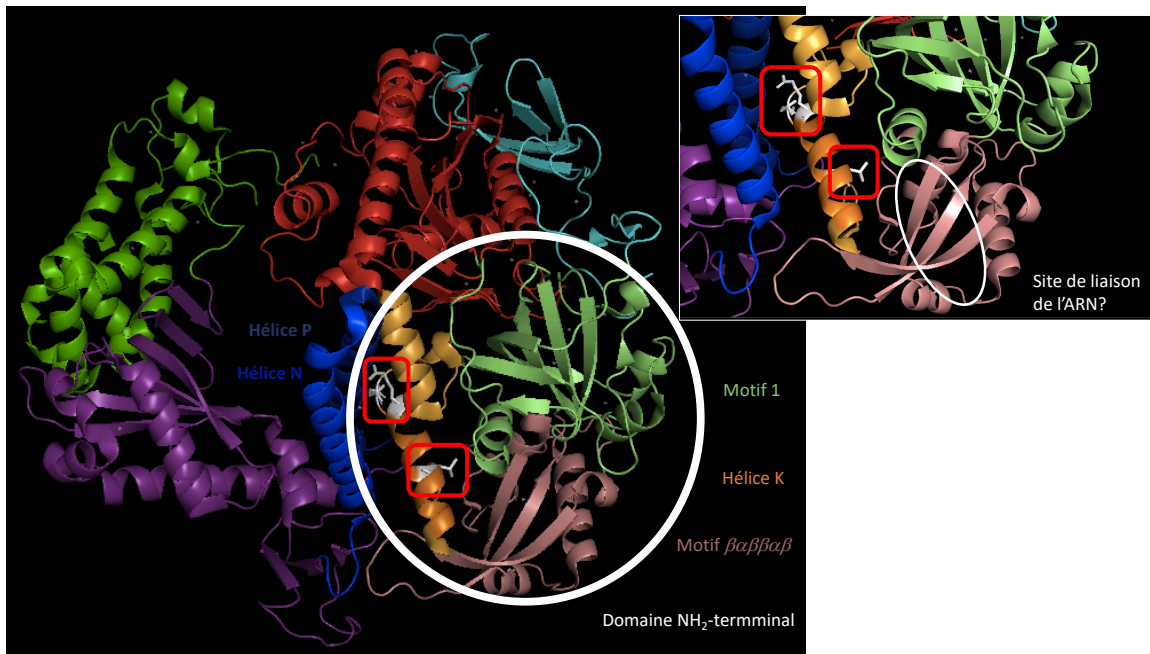


Figure 30 : Localisation sur l'ADN pol du VHS-1 des acides aminés de l'hélice K dont les substitutions sont associées à un défaut de croissance en culture cellulaire.

Représentation d'UL30 dans sa conformation ouverte (PDB 2GV9) montrant les différents domaines : en bleu cyan, le domaine pré-NH₂-terminal; en jaune, le domaine NH₂-terminal avec en orange, l'hélice K; en rouge, le domaine exonucléase; en vert, le pouce; en violet la paume; et en bleu, le domaine des doigts avec en bleu clair, l'hélice P et en bleu foncé, l'hélice N. Les différents motifs du domaine NH₂-terminal sont également représentés : en vert clair, le motif 1, en rose, le motif $\beta\alpha\beta\alpha\beta$ et en jaune, le dernier motif qui contient l'hélice K. Les acides aminés pouvant être associés à un défaut de croissance en culture cellulaire lorsqu'ils sont mutés sont représentés en blanc et encadrés en rouge. Figure réalisée à l'aide du logiciel PyMOL (version 2.3).

Certains codons de la région II du domaine de la paume semblent également être indispensables à l'activité polymérase de l'enzyme étant donné leur position à proximité du site actif (Tableau 8). Ainsi, nous pouvons suggérer que le codon 718 est très important et la présence d'une phénylalanine à cette position semble être primordiale pour l'activité de l'ADN pol (Chapitre 2)[214]. Ces résultats ont été observés à la fois pour le CMV et le VHS-1. Il est à noter que la

substitution F718S dans UL54 est également associée à l'incapacité du virus à se répliquer en culture cellulaire [214]. L'identification de codons clés comme ceux-ci et la compréhension des interactions entre les différents acides aminés dans ces régions permettent de mettre en avant ou d'identifier des régions importantes pour l'enzyme qui pourraient potentiellement être la cible d'antiviraux. Ceux-ci pourraient cibler plus précisément des zones clés de l'ADN pol virale localisées dans le domaine NH₂-terminal et/ou de la paume. La conception d'un nouvel antiviral est développée dans la prochaine partie de la discussion.

D'un autre côté, la sensibilité des virus aux antiviraux peut être affectée différemment par certaines variations d'acides aminés à un codon donné. Nous avons donc analysé l'impact de plusieurs substitutions (V715G/M/S) chez des CMV et VHS-1 recombinants (sensibilités aux antiviraux, capacités répliquatives) mais également sur les protéines recombinantes (leur activité enzymatique et leur inhibition par le FOS) (Chapitre 4). Brièvement, les substitutions V715M et V715S confèrent toutes deux une résistance du CMV au FOS (moyenne des CE₅₀ de 3,7- et 2,8-fois celle du virus sauvage, respectivement) et seule la substitution V715S est associée à une résistance au GCV (moyenne des CE₅₀ de 2,9-fois celle du virus sauvage). À l'opposé, la substitution V715M du VHS-1 est sensible au FOS mais résistante à l'ACV (moyenne des CE₅₀ de 1,5- et 3,4-fois celles du virus sauvage, respectivement) alors que les substitutions V715G et V715S sont toutes les deux associées à une résistance du VHS-1 au FOS (moyenne de CE₅₀ de 3,4- et 5,6-fois celles du virus sauvage, respectivement) ainsi qu'à l'ACV (moyenne de CE₅₀ de 4,6- et 9,2-fois celles du virus sauvage, respectivement). À noter que la substitution théorique V715G que nous avons introduite dans le gène *UL54* (par analogie avec la substitution déjà décrite pour le VHS-1) est associée à un défaut de croissance en culture cellulaire. Ce phénomène a également été observé dans d'autres régions de l'ADN pol. En effet, différentes mutations ont été détectées au codon 756 dans UL54 localisé entre les régions II et VI. Ces substitutions confèrent toutes une résistance du CMV au FOS (E756D/Q/K), mais certaines sont sensibles (E756D/Q) ou résistante (E756K) au GCV [186]. De plus, d'autres mutations à un même codon peuvent être associées à un même phénotype. En effet, les substitutions au codon 413 (D413A/E/N) sont toutes associées à une résistance au GCV et au CDV, mais restent sensibles au FOS [186, 219, 220]. Cela est dû à leur localisation, puisque quasiment toutes les mutations se trouvant dans le domaine exonucléase ont ce phénotype (Annexe A).

Nous avons donc constaté que chaque substitution impactait différemment l'environnement local de la protéine et que ces subtils changements pouvaient avoir de grandes

conséquences sur la sensibilité des virus aux antiviraux mais également sur leur capacité à se répliquer. Pour cela la modélisation des protéines est un outil important. La prochaine section vise à mettre en avant cet outil et l'intérêt qu'il représente dans l'élaboration de nouveaux antiviraux.

De la modélisation des protéines à la conception d'un nouvel antiviral

De manière générale, la modélisation tridimensionnelle est un élément déterminant pour mieux comprendre les mécanismes de fonctionnement des protéines, les interactions protéiques ainsi que l'impact des mutations sur leur structure et les conséquences qui en découlent. Parmi les virus herpétiques humain, seule l'ADN pol du VHS-1 a été cristallisée à ce jour dans sa conformation ouverte [203]; ainsi, bien que la modélisation reste théorique cet outil nous permet d'orienter nos recherches et/ou d'appuyer nos hypothèses. Concernant mes travaux de thèse, la modélisation nous a permis d'appuyer l'hypothèse selon laquelle la résistance du CMV et du VHS-1 au FOS impliquerait une conformation plus ouverte de l'ADN pol à laquelle l'antiviral se lie avec une plus faible affinité. Nous avons vérifié cette hypothèse grâce à des substitutions théoriques qui confèrent une résistance au FOS mais également grâce à celles qui induisent une hypersensibilité du CMV au FOS comme la substitution Q579I. En effet, l'ADN pol UL54 qui possède cette substitution semble au contraire plus stable dans sa conformation fermée. Cependant, la modélisation a ses limites. Bien que les ADN pol des virus herpétiques partagent des domaines très conservés, celles-ci ne sont pas totalement identiques. En effet, nous avons pu constater que les ADN pol du CMV et du VHS-1 présentent des différences au niveau de l'impact des substitutions sur les protéines mais également sur leur sensibilité aux antiviraux. Ce point sera discuté plus en détails dans la dernière partie de la discussion.

Les recherches que nous avons menées avaient pour but de mieux comprendre les mécanismes de résistance qui impliquent des résidus localisés au niveau de l'hélice K du domaine NH₂-terminal et de la région II du domaine de la paume. Le but ultime de ces recherches est d'apporter des informations à la communauté scientifique sur les sites potentiels au niveau de l'ADN pol qui pourraient servir de cibles pour le développement de nouveaux antiviraux basés sur la structure de la protéine et donc *via* des modélisations tridimensionnelles. De nos jours, il est possible d'élaborer un composé ciblant une région précise d'une protéine à partir de la modélisation tridimensionnelle [221]. Ainsi, des cibles potentielles pourraient être les régions où nous avons identifié des acides aminés clés de l'ADN pol, et qui, en les substituant à d'autres acides aminés empêchait la réplication virale. Il serait donc possible de mimer l'effet de la mutation

R581T/R620T (CMV/VHS-1) sur l'environnement local de la protéine, ce qui empêcherait un mouvement correct du domaine des doigts, et par conséquent, les changements de conformation de l'enzyme. Cette approche pourrait permettre d'élaborer de nouveaux composés plus spécifiques. Cependant, la route est longue jusqu'à l'obtention d'un composé actif qui puisse être utilisé en clinique. En effet, plusieurs limites sont associées à cette approche : les modélisations des protéines ciblées peuvent diverger de la réalité puisqu'il s'agit de modèles d'homologie basés sur la structure d'autres protéines (par exemple, UL54 est un modèle d'homologie basé sur UL30 et/ou d'autres polymérases de la famille B); les composés ne seront pas forcément actifs, peuvent être toxiques et de nombreuses expériences *in vitro* seront à réaliser avant une validation des composés potentiels lors d'essais dans des modèles animaux et ultimement de phases cliniques.

Néanmoins, cette approche a déjà fait ses preuves pour différents virus. Ainsi, les composés WIN qui ciblent la protéine VP1 de la capsidie des poliovirus et des rhinovirus ont été étudiés, en partie, virtuellement grâce à l'obtention de la structure de ces virus. Ces composés vont se lier aux protéines de la capsidie VP1 et empêcher les changements de conformation induits par la liaison de la protéine virale à son récepteur cellulaire. Plusieurs dérivés ont ainsi montré une activité antivirale contre certaines infections induites par des rhinovirus (WIN63843) ou des entérovirus (BTA-798) [222-224]. Cependant, des mutations au niveau de la protéine VP1 ont été associées à une résistance des rhinovirus au composé WIN63843 [225]. Il semblerait donc qu'à chaque antiviral développé, une résistance du virus pour cet antiviral soit détectée.

Comme nous avons pu le constater au cours de la pandémie actuelle du SRAS-CoV-2, le repositionnement de drogues est un concept de plus en plus utilisé. Cette approche a pour but une reconversion de composés déjà existants dans un contexte différent (nouveaux virus ou autres cibles). Le repositionnement de molécules semble également être une solution face à l'émergence de résistance aux antiviraux ou si les patients ne répondent pas aux traitements approuvés. Ainsi, il a été montré que le raltegravir, un inhibiteur de la reverse transcriptase du VIH, bloquerait la réplication virale des virus herpétiques [226]. Bien d'autres composés ont montré, *in vitro*, un effet contre le CMV, et c'est le cas du manidipine (traitement de l'hypertension artérielle), de l'émétine et du nitazoxanide (antiparasitaires) [227].

L'utilisation de la modélisation dans le développement de nouveaux antiviraux ainsi que le repositionnement de drogues semblent être des approches prometteuses pour le traitement des infections virales. Malheureusement, cela ne résout pas les problèmes de résistance des virus aux

antiviraux utilisés. C'est pour cela qu'une meilleure compréhension des mécanismes de résistance pourrait permettre de développer des antiviraux ayant une barrière de résistance élevée. La notion de barrière de résistance fait référence à l'équilibre entre l'impact d'une mutation qui confère la résistance à un antiviral sur le « *fitness* » du virus et sa capacité d'évasion à l'antiviral utilisé [228]. On peut donc distinguer des antiviraux ayant une haute barrière de résistance dont la sélection d'une mutation qui confère une résistance est difficile, et à l'opposé, ceux qui sont associés à une faible barrière de résistance et dont les mutations conférant une résistance émergent rapidement et avec un faible impact sur le « *fitness* » viral. Ainsi, S. Chou a constaté que des mutations dans le gène *UL56* codant pour la sous-unité UL56 de la terminase virale qui confèrent une résistance au letermovir apparaissaient rapidement sous pression de sélection à cet antiviral (dès le 3^{ème} passage *in vitro*), ce qui suggère une barrière de résistance faible [229]. Dans cette même étude, ils ont réalisé une pression de sélection au FOS et ont remarqué que les mutations dans le gène *UL54* apparaissaient plus tardivement (en moyenne au 15^{ème} passage). Ainsi, le FOS aurait une barrière de résistance plus élevée. Ceci montre l'importance des études concernant les mécanismes de résistance du CMV et du VHS-1 au FOS, car celui-ci est un très bon antiviral et son mode d'action est privilégié. Le problème de cet antiviral est sa très forte néphrotoxicité ainsi que l'absence de formulation orale.

Le risque zéro n'existant pas, un autre concept permet de contrecarrer ou de réduire les problèmes associés à la résistance aux antiviraux. Il s'agit de la combinaison d'antiviraux ayant des cibles différentes comme les protéines du CMV *UL54* et *UL56* ou différentes cibles au sein d'une même protéine [148, 230]. Ainsi, en ce qui concerne les ADN pol du CMV et du VHS-1, il serait intéressant de pouvoir cibler les régions qui interagissent avec les domaines des doigts pour bloquer les changements de conformation. À partir de nos résultats, nous pouvons suggérer de cibler les interactions entre le domaine NH₂-terminal, plus précisément l'hélice K avec le domaine des doigts, et en parallèle, cibler le site catalytique de l'enzyme soit au niveau du domaine de la paume (région II) et empêcher les interactions entre le domaine des doigts et celui de la paume. Cela permettrait ainsi de déstabiliser la bonne conformation de la protéine en ciblant le domaine NH₂-terminal, de bloquer le site catalytique (domaine de la paume) et d'empêcher les changements de conformation de l'ADN pol nécessaire à la polymérisation de l'ADN viral. Sur base des résultats obtenus au cours de cette thèse et des données de la littérature, en comparant les deux régions étudiées, le domaine de la paume semble être une cible prometteuse puisqu'il possède le domaine catalytique et donc des acides aminés clés tel que la phénylalanine à la position 718.

Une étape clé qui permettrait d'éclairer certains points encore nébuleux sur la compréhension de l'ADN pol du CMV est sa cristallisation; pourquoi en 2021 est-il encore impossible de cristalliser cette protéine?

Expression d'UL54 et cristallisation de l'enzyme

Au cours de mon doctorat, je me suis rendue compte de la complexité des ADN pol, en particulier celle du CMV. Cette enzyme est difficile à exprimer en grandes quantités et à purifier, ce qui rend sa cristallisation très complexe. Nous avons tenté d'étudier la liaison du FOS aux protéines UL54 sauvage et possédant des mutations conférant la résistance au FOS. Cette étude a été initiée par nos collaborateurs de l'Université de Sherbrooke, le Dr. Martin Bisailon et son étudiante Andréa Allaire. La première étape critique a été d'exprimer la protéine UL54. Pour cela, ils ont utilisé une protéine tronquée qui possédait seulement le domaine catalytique de l'enzyme. Plusieurs systèmes existent pour exprimer les protéines. Dans cette étude, les ADN pol tronquées étaient exprimées dans des bactéries *E. Coli*. Les protéines produites se trouvaient dans des corps d'inclusions et un cycle de dénaturation-renaturation des protéines était nécessaire pour les solubiliser. La structure secondaire des protéines était vérifiée par dichroïsme circulaire et les protéines tronquées étaient correctement repliées. Cependant, les protéines produites n'étaient pas actives et les tests de liaison du FOS déterminés par titration calorimétrique isotherme (ITC) n'étaient pas concluants. Un autre système intéressant qui pourrait être utilisé serait d'exprimer les protéines en baculovirus dans des cellules d'insectes, tel que cela a été fait pour UL30 [231]. Bien que prometteur, ce projet a été abandonné. Il nous aurait permis de valider les hypothèses des mécanismes de résistance quant à la diminution ou à l'augmentation de l'affinité de la liaison du FOS aux protéines mutées.

Une étape cruciale à la validation de toutes nos hypothèses et à la compréhension de la structure et des fonctions de l'ADN pol du CMV est sa cristallisation. En effet, l'incapacité de produire en grandes quantités la protéine purifiée nous empêche d'obtenir son cristal. Or, cela nous permettrait d'établir la structure tridimensionnelle de l'ADN pol du CMV afin d'affiner nos hypothèses et de déterminer les différences entre les ADN pol du CMV et celle du VHS-1. Dans une étude récente, Malby *et al.* ont montré la complexité d'exprimer l'ADN pol θ humaine qui fait partie des ADN pol de la famille A [232]. Celle-ci est également encodée par un gène de longue taille 2590 pb. Après différents essais, cette équipe a réussi à exprimer le domaine polymérase de la protéine. Un point marquant de cette étude a été l'avantage de cristalliser la protéine dans son

complexe ternaire, c'est-à-dire associée à l'ADN et au nucléotide suivant. Bien que chaque protéine ait sa propre complexité, les recherches effectuées sur les ADN pol et les nouvelles technologies nous donnent les moyens d'espérer cristalliser UL54 dans les prochaines années.

Parmi les ADN pol des virus herpétiques humains, seule celle du VHS-1 a été cristallisée [203]. Ce bilan est-il associé à la difficulté d'exprimer les ADN pol ou par manque de recherches concernant ces protéines? Comprendre ce qui est commun entre des protéines virales est indispensable mais ce qui les différencie me semble plus intrigant et pourrait être la réponse à de nombreuses questions.

Comparaison du cytomegalovirus humain et du virus herpès simplex 1

Le CMV et le VHS-1 appartiennent à la famille des *Herpesviridae*. Ils infectent tous deux l'humain mais ont des divergences biologiques qui les différencient et qui justifient leur appartenance à deux sous-familles. Ces caractéristiques distinctes sont donc associées à des avantages et des inconvénients pour l'un comme pour l'autre. Ainsi, le CMV a un cycle répliatif lent alors que le VHS-1 a un cycle répliatif rapide, ce qui permet de générer les virus en moins d'une semaine. Il faut attendre au moins une quinzaine de jours pour générer les CMV recombinants. De plus, il était possible d'obtenir les résultats des tests de sensibilité aux antiviraux en six jours pour le CMV et en trois jours pour le VHS-1. Par contre, la technique utilisée pour les analyses de sensibilité du CMV (activité de la G-Luc) était plus objective et plus rapide que le test de réduction de plaques (VHS-1) qui est plus subjectif. En effet, cette technique est celle qui est requise pour le VHS-1, mais elle démontre des variations inter-laboratoires et également intra-laboratoire car ils dépendent de la personne qui dénombre les effets cytopathiques, ce qui est plutôt subjectif. De plus, dépendamment des virus recombinants mutants, la taille des foyers infectieux va varier car ils reflètent les capacités répliatives virales; ainsi certains virus produisent des foyers plus petits que le virus sauvage. Ce phénotype a déjà été observé [195], il faut donc avoir le réflexe de s'adapter à chaque virus recombinants mutants pour bien identifier les foyers infectieux.

L'avantage de ce projet a été de pouvoir comparer ces deux virus, l'impact des mutations sur les protéines, sur leur capacité répliative et sur leur sensibilité aux antiviraux. En effet, c'était très intéressant d'identifier des substitutions équivalentes pour ces deux virus qui conféraient des phénotypes de sensibilité aux antiviraux différents. Le CMV et le VHS-1 appartiennent à la même famille mais se comportent différemment. Ainsi, en nous basant sur les substitutions qui

empêchaient les virus de croître en culture cellulaire, nous supposons que le CMV serait plus susceptible que le VHS-1 aux substitutions introduites dans les gènes codant pour les ADN pol; cela reste une hypothèse à étudier. En effet, nous avons identifié deux substitutions (P712Y et V715G) qui étaient associées à un défaut de croissance des CMV recombinants possédant ces substitutions alors qu'il était possible de générer les VHS-1 recombinants P712Y et V715G. Les tailles des gènes *UL54* et *UL30* sont quasiment équivalents, 1242 *versus* 1235 acides aminés, respectivement. Cependant, l'ADN pol du CMV semble beaucoup plus complexe et moins tolérante aux modifications que celle du VHS-1. Cela serait-il relié au fait que l'ADN pol du CMV doive répliquer un génome plus grand que celui du VHS-1?

Conclusion

Grâce aux recherches fondamentales et appliquées, nous sommes capables aujourd'hui de « prédire » des mutations qui pourraient être associées à la résistance aux antiviraux. Cela permet non seulement de mieux comprendre les mécanismes de résistance associés à cet antiviral, mais également d'identifier les éléments clés de sa cible. De plus, nous pouvons aussi, avant de mettre sur le marché un antiviral ou de pousser plus loin les études cliniques, déterminer par pression de sélection sous un antiviral si des mutations de résistance apparaîtront, si une combinaison avec d'autres antiviraux est possible et si un nouvel antiviral est efficace contre des virus multi-résistants. Certes, nous n'avons pas encore de vaccins contre le CMV ni le VHS-1, mais des progrès sont faits et nous comprenons de mieux en mieux ces virus qui semblent bien trop communs et qui malheureusement restent encore associés à un taux de morbidité et de mortalité considérable chez les patients immunosupprimés. L'avantage du FOS, antiviral de seconde ligne, repose sur le fait qu'il ne nécessite pas d'activation et qu'il agit directement en se liant à l'ADN pol. Les résultats que nous avons obtenus au cours de ma thèse ont montré que des acides aminés localisés dans les domaines NH₂-terminal (hélice K) et de la paume (région II) sont également impliqués dans la sensibilité du CMV et du VHS-1 au FOS puisque des substitutions dans cette région de l'ADN pol sont associées à une hypersensibilité et à une résistance à cet antiviral. Ces résultats ont été confirmés par des tests d'inhibition des ADN pol possédant ces différentes mutations au FOS et sont associés, à différents niveaux, à une diminution de l'activité de polymérisation de l'enzyme, ce qui pourrait expliquer l'impact observé sur les capacités répliquatives. Ces résultats complètent nos connaissances sur les mécanismes de résistance du CMV et du VHS-1 au FOS qui impliquent ces différents domaines de l'ADN pol. Cependant, de nombreux points restent à éclaircir quant aux mécanismes de résistance aux analogues de nucléosides, mais également concernant les mutations qui sont associées à des multi-résistances des virus herpétiques aux antiviraux.

De manière plus générale, il est bien connu que les virus à ADN ont un taux de mutations spontanées plus faible que les virus à ARN. Il est donc important de souligner la capacité de l'ADN pol UL54 du CMV qui semble très fragile mais qui réplique un génome de 235 kbp et qui résiste à de multiples antiviraux. Le CMV et le VHS-1 seront donc toujours étudiés en recherche fondamentale pour leur capacité à établir la latence, le lien qu'ils établissent avec le système immunitaire et l'apparition des mutations associées à une résistance à chaque antiviral développé.

Bibliographie

1. Davison, A. *Taxonomic proposals from the Herpesviridae*. 2008; Available from: <https://talk.ictvonline.org/ictv/proposals/2005.020-72.04.Herpes.pdf>.
2. Davison, A.J., et al., *The order Herpesvirales*. Arch Virol, 2009. **154**(1): p. 171-7.
3. Pellet, P.E. and B. Roizman, *Herpesviridae*, in *Fields Virology*, D.M. Knipe and P.M. Howley, Editors. 2013, Lippincott Williams: Philadelphia. p. 1802-1822.
4. McGeoch, D.J., F.J. Rixon, and A.J. Davison, *Topics in herpesvirus genomics and evolution*. Virus Res, 2006. **117**(1): p. 90-104.
5. Mocarski, E.S. and Courcelle. C.T., *Cytomegaloviruses and their replication*, in *Fields Virology*, D.M. Knipe and P.M. Howley, Editors. 2013, Lippincott Williams & Wilkins: Philadelphia. p. 2629-2673.
6. Yamanishi, K., *Human Herpesvirus 6 and Human Herpesvirus 7*, in *Fields Virology*, D.M. Knipe and P.M. Howley, Editors. 2013, Lippincott Williams & Wilkins: Philadelphia. p. 2785-2802.
7. Yu, X., et al., *Atomic structure of the human cytomegalovirus capsid with its securing tegument layer of pp150*. Science, 2017. **356**(6345).
8. Baines, J.D., *Herpes simplex virus capsid assembly and DNA packaging: a present and future antiviral drug target*. Trends Microbiol, 2011. **19**(12): p. 606-13.
9. Trus, B.L., et al., *Allosteric signaling and a nuclear exit strategy: binding of UL25/UL17 heterodimers to DNA-Filled HSV-1 capsids*. Mol Cell, 2007. **26**(4): p. 479-89.
10. Chee, M., et al., *Identification of the major capsid protein gene of human cytomegalovirus*. J Virol, 1989. **63**(3): p. 1345-53.
11. Zhou, Z.H., et al., *Assembly of VP26 in herpes simplex virus-1 inferred from structures of wild-type and recombinant capsids*. Nat Struct Biol, 1995. **2**(11): p. 1026-30.
12. Newcomb, W.W., et al., *The UL6 gene product forms the portal for entry of DNA into the herpes simplex virus capsid*. J Virol, 2001. **75**(22): p. 10923-32.
13. Newcomb, W.W., et al., *Structure of the herpes simplex virus capsid. Molecular composition of the pentons and the triplexes*. J Mol Biol, 1993. **232**(2): p. 499-511.
14. Booy, F.P., et al., *Finding a needle in a haystack: detection of a small protein (the 12-kDa VP26) in a large complex (the 200-MDa capsid of herpes simplex virus)*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1994. **91**(12): p. 5652-6.
15. Kornfeind, E.M. and R.J. Visalli, *Human herpesvirus portal proteins: Structure, function, and antiviral prospects*. Rev Med Virol, 2018. **28**(3): p. e1972.
16. Isaacson, M.K., L.K. Juckem, and T. Compton, *Virus entry and innate immune activation*. Curr Top Microbiol Immunol, 2008. **325**: p. 85-100.
17. Krzyzaniak, M., M. Mach, and W.J. Britt, *The cytoplasmic tail of glycoprotein M (gpUL100) expresses trafficking signals required for human cytomegalovirus assembly and replication*. J Virol, 2007. **81**(19): p. 10316-28.
18. Close, W.L., A.N. Anderson, and P.E. Pellett, *Betaherpesvirus Virion Assembly and Egress*. Adv Exp Med Biol, 2018. **1045**: p. 167-207.
19. Schultz, E.P., et al., *Scanning Mutagenesis of Human Cytomegalovirus Glycoprotein gH/gL*. J Virol, 2015. **90**(5): p. 2294-305.
20. Nogalski, M.T., et al., *The HCMV gH/gL/UL128-131 complex triggers the specific cellular activation required for efficient viral internalization into target monocytes*. PLoS Pathog, 2013. **9**(7): p. e1003463.
21. Ryckman, B.J., et al., *Characterization of the human cytomegalovirus gH/gL/UL128-131 complex that mediates entry into epithelial and endothelial cells*. J Virol, 2008. **82**(1): p. 60-70.

22. Ciferri, C., et al., *Structural and biochemical studies of HCMV gH/gL/gO and Pentamer reveal mutually exclusive cell entry complexes*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2015. **112**(6): p. 1767-72.
23. Guo, H., et al., *Role of tegument proteins in herpesvirus assembly and egress*. Protein Cell, 2010. **1**(11): p. 987-98.
24. Smith, R.M., S. Kosuri, and J.A. Kerry, *Role of human cytomegalovirus tegument proteins in virion assembly*. Viruses, 2014. **6**(2): p. 582-605.
25. Varnum, S.M., et al., *Identification of proteins in human cytomegalovirus (HCMV) particles: the HCMV proteome*. J Virol, 2004. **78**(20): p. 10960-6.
26. Romanowski, M.J., E. Garrido-Guerrero, and T. Shenk, *pIRS1 and pTRS1 are present in human cytomegalovirus virions*. J Virol, 1997. **71**(7): p. 5703-5.
27. Winkler, M. and T. Stamminger, *A specific subform of the human cytomegalovirus transactivator protein pUL69 is contained within the tegument of virus particles*. J Virol, 1996. **70**(12): p. 8984-7.
28. Liu, B. and M.F. Stinski, *Human cytomegalovirus contains a tegument protein that enhances transcription from promoters with upstream ATF and AP-1 cis-acting elements*. J Virol, 1992. **66**(7): p. 4434-44.
29. Arii, J. and Y. Kawaguchi, *The Role of HSV Glycoproteins in Mediating Cell Entry*. Adv Exp Med Biol, 2018. **1045**: p. 3-21.
30. Campbell, M.E., J.W. Palfreyman, and C.M. Preston, *Identification of herpes simplex virus DNA sequences which encode a trans-acting polypeptide responsible for stimulation of immediate early transcription*. J Mol Biol, 1984. **180**(1): p. 1-19.
31. Davison, A.J., *Human Herpesviruses: Biology, Therapy, and Immunoprophylaxis*. Cambridge Press: Cambridge, 2007. p. 10-26.
32. Zarrouk, K., J. Piret, and G. Boivin, *Herpesvirus DNA polymerases: Structures, functions and inhibitors*. Virus Res, 2017. **234**: p. 177-192.
33. Abdellatif, M.E.A., C. Sinzger, and P. Walther, *Investigating HCMV entry into host cells by STEM tomography*. J Struct Biol, 2018. **204**(3): p. 406-419.
34. Nguyen, C.C. and J.P. Kamil, *Pathogen at the Gates: Human Cytomegalovirus Entry and Cell Tropism*. Viruses, 2018. **10**(12).
35. Nicola, A.V., *Herpesvirus Entry into Host Cells Mediated by Endosomal Low pH*. Traffic, 2016. **17**(9): p. 965-75.
36. Spear, P.G., *Herpes simplex virus: receptors and ligands for cell entry*. Cell Microbiol, 2004. **6**(5): p. 401-10.
37. Montgomery, R.I., et al., *Herpes simplex virus-1 entry into cells mediated by a novel member of the TNF/NGF receptor family*. Cell, 1996. **87**(3): p. 427-36.
38. Shukla, D., et al., *A novel role for 3-O-sulfated heparan sulfate in herpes simplex virus 1 entry*. Cell, 1999. **99**(1): p. 13-22.
39. Reske, A., et al., *Understanding HSV-1 entry glycoproteins*. Rev Med Virol, 2007. **17**(3): p. 205-15.
40. Zeev-Ben-Mordehai, T., et al., *Two distinct trimeric conformations of natively membrane-anchored full-length herpes simplex virus 1 glycoprotein B*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2016. **113**(15): p. 4176-81.
41. Anders, D.G., et al., *Boundaries and structure of human cytomegalovirus oriLyt, a complex origin for lytic-phase DNA replication*. J Virol, 1992. **66**(6): p. 3373-84.
42. Masse, M.J., et al., *Human cytomegalovirus origin of DNA replication (oriLyt) resides within a highly complex repetitive region*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1992. **89**(12): p. 5246-50.
43. Zhu, Y., L. Huang, and D.G. Anders, *Human cytomegalovirus oriLyt sequence requirements*. J Virol, 1998. **72**(6): p. 4989-96.

44. Xu, Y., et al., *Human cytomegalovirus DNA replication requires transcriptional activation via an IE2- and UL84-responsive bidirectional promoter element within oriLyt*. J Virol, 2004. **78**(21): p. 11664-77.
45. Sarisky, R.T. and G.S. Hayward, *Evidence that the UL84 gene product of human cytomegalovirus is essential for promoting oriLyt-dependent DNA replication and formation of replication compartments in cotransfection assays*. J Virol, 1996. **70**(11): p. 7398-413.
46. Zarrouk, K., J. Piret, and G. Boivin, *Herpesvirus DNA polymerases: Structures, functions and inhibitors*. Virus Res, 2017.
47. Roizman, B., D.M. Knipe, and R.J. Whitley, *Herpes Simplex Viruses*, in *Fields Virology*, D.M. Knipe and P.M. Howley, Editors. 2013, Lippincott Williams & Wilkins: Philadelphia. p. 1823-1897.
48. Boehmer, P.E. and A.V. Nimonkar, *Herpes virus replication*. IUBMB Life, 2003. **55**(1): p. 13-22.
49. Weller, S.K., et al., *Cloning, sequencing, and functional analysis of oriL, a herpes simplex virus type 1 origin of DNA synthesis*. Mol Cell Biol, 1985. **5**(5): p. 930-42.
50. Weller, S.K. and D.M. Coen, *Herpes simplex viruses: mechanisms of DNA replication*. Cold Spring Harb Perspect Biol, 2012. **4**(9): p. a013011.
51. Boehmer, P.E., M.S. Dodson, and I.R. Lehman, *The herpes simplex virus type-1 origin binding protein. DNA helicase activity*. J Biol Chem, 1993. **268**(2): p. 1220-5.
52. Boehmer, P.E. and I.R. Lehman, *Herpes simplex virus DNA replication*. Annu Rev Biochem, 1997. **66**: p. 347-84.
53. Skaliter, R., et al., *Rolling circle DNA replication by extracts of herpes simplex virus type 1-infected human cells*. J Virol, 1996. **70**(2): p. 1132-6.
54. Deiss, L.P. and N. Frenkel, *Herpes simplex virus amplicon: cleavage of concatemeric DNA is linked to packaging and involves amplification of the terminally reiterated a sequence*. J Virol, 1986. **57**(3): p. 933-41.
55. Bogner, E., K. Radsak, and M.F. Stinski, *The gene product of human cytomegalovirus open reading frame UL56 binds the pac motif and has specific nuclease activity*. J Virol, 1998. **72**(3): p. 2259-64.
56. Poole, E. and J. Sinclair, *Sleepless latency of human cytomegalovirus*. Med Microbiol Immunol, 2015. **204**(3): p. 421-9.
57. Hahn, G., R. Jores, and E.S. Mocarski, *Cytomegalovirus remains latent in a common precursor of dendritic and myeloid cells*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1998. **95**(7): p. 3937-42.
58. Sinclair, J.H. and M.B. Reeves, *Human cytomegalovirus manipulation of latently infected cells*. Viruses, 2013. **5**(11): p. 2803-24.
59. Reeves, M.B., et al., *Latency, chromatin remodeling, and reactivation of human cytomegalovirus in the dendritic cells of healthy carriers*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2005. **102**(11): p. 4140-5.
60. Taylor-Wiedeman, J., P. Sissons, and J. Sinclair, *Induction of endogenous human cytomegalovirus gene expression after differentiation of monocytes from healthy carriers*. J Virol, 1994. **68**(3): p. 1597-604.
61. Huang, M.M., et al., *Efficient human cytomegalovirus reactivation is maturation dependent in the Langerhans dendritic cell lineage and can be studied using a CD14+ experimental latency model*. J Virol, 2012. **86**(16): p. 8507-15.
62. Umbach, J.L., et al., *MicroRNAs expressed by herpes simplex virus 1 during latent infection regulate viral mRNAs*. Nature, 2008. **454**(7205): p. 780-3.
63. Stevens, J.G., et al., *RNA complementary to a herpesvirus alpha gene mRNA is prominent in latently infected neurons*. Science, 1987. **235**(4792): p. 1056-9.

64. Owen, D.J., C.M. Crump, and S.C. Graham, *Tegument Assembly and Secondary Envelopment of Alphaherpesviruses*. *Viruses*, 2015. **7**(9): p. 5084-114.
65. Koonin, E.V., *Temporal order of evolution of DNA replication systems inferred by comparison of cellular and viral DNA polymerases*. *Biol Direct*, 2006. **1**: p. 39.
66. Braithwaite, D.K. and J. Ito, *Compilation, alignment, and phylogenetic relationships of DNA polymerases*. *Nucleic Acids Res*, 1993. **21**(4): p. 787-802.
67. Liu, S. and F.L. Homa, *Atomic structure of the herpes simplex virus 1 DNA polymerase*, in *Viral genome replication*, D.K. Raney, M. Gotte, and E.C. Cameron, Editors. 2009, Springer US: Boston. p. 365-381.
68. Rothwell, P.J. and G. Waksman, *Structure and mechanism of DNA polymerases*. *Adv Protein Chem*, 2005. **71**: p. 401-40.
69. Knopf, C.W., *Evolution of viral DNA-dependent DNA polymerases*. *Virus Genes*, 1998. **16**(1): p. 47-58.
70. Sinigalia, E., et al., *Role of homodimerization of human cytomegalovirus DNA polymerase accessory protein UL44 in origin-dependent DNA replication in cells*. *J Virol*, 2008. **82**(24): p. 12574-9.
71. Chow, C.S. and D.M. Coen, *Mutations that specifically impair the DNA binding activity of the herpes simplex virus protein UL42*. *J Virol*, 1995. **69**(11): p. 6965-71.
72. Nishiyama, Y., K. Maeno, and S. Yoshida, *Characterization of human cytomegalovirus-induced DNA polymerase and the associated 3'-to-5', exonuclease*. *Virology*, 1983. **124**(2): p. 221-31.
73. Lehman, I.R. and P.E. Boehmer, *Replication of herpes simplex virus DNA*. *J Biol Chem*, 1999. **274**(40): p. 28059-62.
74. Song, L., et al., *Contribution of the 3'- to 5'-exonuclease activity of herpes simplex virus type 1 DNA polymerase to the fidelity of DNA synthesis*. *J Biol Chem*, 2004. **279**(18): p. 18535-43.
75. Mocarski, E.S., et al., *Cytomegalovirus*, in *Fields Virology*, D.M. Knipe and P.M. Howley, Editors. 2013, Lippincott Williams & Wilkins: Philadelphia. p. 1960-2014.
76. Limaye, A.P., et al., *High incidence of ganciclovir-resistant cytomegalovirus infection among lung transplant recipients receiving preemptive therapy*. *J Infect Dis*, 2002. **185**(1): p. 20-7.
77. Crough, T. and R. Khanna, *Immunobiology of human cytomegalovirus: from bench to bedside*. *Clin Microbiol Rev*, 2009. **22**(1): p. 76-98, Table of Contents.
78. Arvin, A., et al., *Human Herpesviruses: Biology, Therapy, and Immunoprophylaxis*. 2007.
79. Green, M.L., et al., *Cytomegalovirus viral load and mortality after haemopoietic stem cell transplantation in the era of pre-emptive therapy: a retrospective cohort study*. *Lancet Haematol*, 2016. **3**(3): p. e119-27.
80. Yong, M.K., et al., *New Advances in the Management of Cytomegalovirus in Allogeneic Haemopoietic Stem Cell Transplantation*. *Intern Med J*, 2019.
81. Gianella, S. and S. Letendre, *Cytomegalovirus and HIV: A Dangerous Pas de Deux*. *J Infect Dis*, 2016. **214 Suppl 2**: p. S67-74.
82. Springer, K.L. and A. Weinberg, *Cytomegalovirus infection in the era of HAART: fewer reactivations and more immunity*. *J Antimicrob Chemother*, 2004. **54**(3): p. 582-6.
83. Kylat, R.I., E.N. Kelly, and E.L. Ford-Jones, *Clinical findings and adverse outcome in neonates with symptomatic congenital cytomegalovirus (SCCMV) infection*. *Eur J Pediatr*, 2006. **165**(11): p. 773-8.
84. Fowler, K.B. and S.B. Boppana, *Congenital cytomegalovirus infection*. *Semin Perinatol*, 2018. **42**(3): p. 149-154.
85. *StatPearls*. 2019.
86. Picone, O., et al., *A series of 238 cytomegalovirus primary infections during pregnancy: description and outcome*. *Prenat Diagn*, 2013. **33**(8): p. 751-8.

87. Pass, R.F., *Cytomegalovirus infection*. *Pediatr Rev*, 2002. **23**(5): p. 163-70.
88. Kenneson, A. and M.J. Cannon, *Review and meta-analysis of the epidemiology of congenital cytomegalovirus (CMV) infection*. *Rev Med Virol*, 2007. **17**(4): p. 253-76.
89. Akpan, U.S. and Pillarisetty, L.S., *Congenital Cytomegalovirus Infection (Congenital CMV Infection)*. 2020.
90. Lanzieri, T.M., et al., *Long-term outcomes of children with symptomatic congenital cytomegalovirus disease*. *J Perinatol*, 2017. **37**(7): p. 875-880.
91. Schleiss, M.R., S.R. Permar, and S.A. Plotkin, *Progress toward Development of a Vaccine against Congenital Cytomegalovirus Infection*. *Clin Vaccine Immunol*, 2017. **24**(12).
92. Kotton, C.N., *CMV: Prevention, diagnosis and therapy*. *Am J Transplant*, 2013. **13 Suppl 3**: p. 24-40; quiz 40.
93. World Health Organisation. *Herpes simplex virus*. 2017; Available from: <https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/herpes-simplex-virus#hsv1>.
94. Farooq, A.V. and D. Shukla, *Herpes simplex epithelial and stromal keratitis: an epidemiologic update*. *Surv Ophthalmol*, 2012. **57**(5): p. 448-62.
95. Looker, K.J., et al., *First estimates of the global and regional incidence of neonatal herpes infection*. *Lancet Glob Health*, 2017. **5**(3): p. e300-e309.
96. Whitley, R., *Neonatal herpes simplex virus infection*. *Curr Opin Infect Dis*, 2004. **17**(3): p. 243-6.
97. Rozenberg, F., C. Deback, and H. Agut, *Herpes simplex encephalitis : from virus to therapy*. *Infect Disord Drug Targets*, 2011. **11**(3): p. 235-50.
98. Munawwar, A. and S. Singh, *Human Herpesviruses as Copathogens of HIV Infection, Their Role in HIV Transmission, and Disease Progression*. *J Lab Physicians*, 2016. **8**(1): p. 5-18.
99. Dinotta, F., et al., *Disseminated herpes simplex infection in a HIV+ patient*. *G Ital Dermatol Venereol*, 2009. **144**(2): p. 205-9.
100. Whitley, R.J., et al., *Vidarabine therapy for mucocutaneous herpes simplex virus infections in the immunocompromised host*. *J Infect Dis*, 1984. **149**(1): p. 1-8.
101. LeGoff, J., H. Péré, and L. Bélec, *Diagnosis of genital herpes simplex virus infection in the clinical laboratory*. *Virol J*, 2014. **11**: p. 83.
102. Bradshaw, M.J. and A. Venkatesan, *Herpes simplex virus-1 encephalitis in adults: Pathophysiology, diagnosis, and management*. *Neurotherapeutics*, 2016. **13**(3): p. 493-508.
103. Ankel, H., et al., *Induction of interferon-alpha by glycoprotein D of herpes simplex virus: a possible role of chemokine receptors*. *Virology*, 1998. **251**(2): p. 317-26.
104. Melchjorsen, J., *Sensing herpes: more than toll*. *Rev Med Virol*, 2012. **22**(2): p. 106-21.
105. Boehme, K.W., M. Guerrero, and T. Compton, *Human cytomegalovirus envelope glycoproteins B and H are necessary for TLR2 activation in permissive cells*. *J Immunol*, 2006. **177**(10): p. 7094-102.
106. Rathinam, V.A. and K.A. Fitzgerald, *Innate immune sensing of DNA viruses*. *Virology*, 2011. **411**(2): p. 153-62.
107. Brisse, M. and H. Ly, *Comparative Structure and Function Analysis of the RIG-I-Like Receptors: RIG-I and MDA5*. *Front Immunol*, 2019. **10**: p. 1586.
108. Ni, G., Z. Ma, and B. Damania, *cGAS and STING: At the intersection of DNA and RNA virus-sensing networks*. *PLoS Pathog*, 2018. **14**(8): p. e1007148.
109. Picarda, G. and C.A. Benedict, *Cytomegalovirus: Shape-Shifting the Immune System*. *J Immunol*, 2018. **200**(12): p. 3881-3889.
110. Jenks, J.A., M.L. Goodwin, and S.R. Permar, *The Roles of Host and Viral Antibody Fc Receptors in Herpes Simplex Virus (HSV) and Human Cytomegalovirus (HCMV) Infections and Immunity*. *Front Immunol*, 2019. **10**: p. 2110.

111. La Rosa, C. and D.J. Diamond, *The immune response to human CMV*. *Future Virol*, 2012. **7**(3): p. 279-293.
112. Jahanban-Esfahlan, R., et al., *Toll-like receptors as novel therapeutic targets for herpes simplex virus infection*. *Rev Med Virol*, 2019. **29**(4): p. e2048.
113. Peri, P., et al., *Herpes simplex virus type 1 Us3 gene deletion influences toll-like receptor responses in cultured monocytic cells*. *Virol J*, 2008. **5**: p. 140.
114. Daubeuf, S., et al., *HSV ICP0 recruits USP7 to modulate TLR-mediated innate response*. *Blood*, 2009. **113**(14): p. 3264-75.
115. Liu, X., et al., *Herpesvirus tegument protein activates NF-kappaB signaling through the TRAF6 adaptor protein*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2008. **105**(32): p. 11335-9.
116. Institute of Medicine (US) Committee to Study Priorities for Vaccine Development, *Vaccines for the 21st Century: A Tool for Decisionmaking*. 2000.
117. Manicklal, S., et al., *The "silent" global burden of congenital cytomegalovirus*. *Clin Microbiol Rev*, 2013. **26**(1): p. 86-102.
118. Wang, D., et al., *A replication-defective human cytomegalovirus vaccine for prevention of congenital infection*. *Sci Transl Med*, 2016. **8**(362): p. 362ra145.
119. Liu, Y., et al., *A Replication-Defective Human Cytomegalovirus Vaccine Elicits Humoral Immune Responses Analogous to Those with Natural Infection*. *J Virol*, 2019. **93**(23).
120. Pass, R.F., et al., *Vaccine prevention of maternal cytomegalovirus infection*. *N Engl J Med*, 2009. **360**(12): p. 1191-9.
121. Mori, T., et al., *Safety of ASP0113, a cytomegalovirus DNA vaccine, in recipients undergoing allogeneic hematopoietic cell transplantation: an open-label phase 2 trial*. *Int J Hematol*, 2017. **105**(2): p. 206-212.
122. Kharfan-Dabaja, M.A., et al., *A novel therapeutic cytomegalovirus DNA vaccine in allogeneic haemopoietic stem-cell transplantation: a randomised, double-blind, placebo-controlled, phase 2 trial*. *Lancet Infect Dis*, 2012. **12**(4): p. 290-9.
123. Kirchmeier, M., et al., *Enveloped virus-like particle expression of human cytomegalovirus glycoprotein B antigen induces antibodies with potent and broad neutralizing activity*. *Clin Vaccine Immunol*, 2014. **21**(2): p. 174-80.
124. Bernstein, D.I., et al., *Randomized, double-blind, Phase I trial of an alphavirus replicon vaccine for cytomegalovirus in CMV seronegative adult volunteers*. *Vaccine*, 2009. **28**(2): p. 484-93.
125. Aschner, C.B. and B.C. Herold, *Alphaherpesvirus Vaccines*. *Curr Issues Mol Biol*, 2021. **41**: p. 469-508.
126. Belshe, R.B., et al., *Efficacy results of a trial of a herpes simplex vaccine*. *N Engl J Med*, 2012. **366**(1): p. 34-43.
127. Chiuppesi, F., et al., *A lentiviral vector-based, herpes simplex virus 1 (HSV-1) glycoprotein B vaccine affords cross-protection against HSV-1 and HSV-2 genital infections*. *J Virol*, 2012. **86**(12): p. 6563-74.
128. Andrei, G., E. de Clercq, and R. Snoeck, *Viral DNA polymerase inhibitors*, in *Viral genome replication*, C.E. Cameron, M. Gotte, and K. Raney, Editors. 2009, Springer: New York. p. 481-526.
129. Faulds, D. and R.C. Heel, *Ganciclovir. A review of its antiviral activity, pharmacokinetic properties and therapeutic efficacy in cytomegalovirus infections*. *Drugs*, 1990. **39**(4): p. 597-638.
130. Gentry, B.G., et al., *Phosphorylation of antiviral and endogenous nucleotides to di- and triphosphates by guanosine monophosphate kinase*. *Biochem Pharmacol*, 2011. **81**(1): p. 43-9.
131. Matthews, T. and R. Boehme, *Antiviral activity and mechanism of action of ganciclovir*. *Rev Infect Dis*, 1988. **10 Suppl 3**: p. S490-4.

132. Britt, W.J. and M.N. Prichard, *New therapies for human cytomegalovirus infections*. Antiviral Res, 2018. **159**: p. 153-174.
133. Biron, K.K., et al., *Metabolic activation of the nucleoside analog 9-[(2-hydroxy-1-(hydroxymethyl)ethoxy)methyl]guanine in human diploid fibroblasts infected with human cytomegalovirus*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1985. **82**(8): p. 2473-7.
134. Razonable, R.R. and C.V. Paya, *Valganciclovir for the prevention and treatment of cytomegalovirus disease in immunocompromised hosts*. Expert Rev Anti Infect Ther, 2004. **2**(1): p. 27-41.
135. Reardon, J.E. and T. Spector, *Herpes simplex virus type 1 DNA polymerase. Mechanism of inhibition by acyclovir triphosphate*. J Biol Chem, 1989. **264**(13): p. 7405-11.
136. MacDougall, C. and B.J. Guglielmo, *Pharmacokinetics of valganciclovir*. J Antimicrob Chemother, 2004. **53**(6): p. 899-901.
137. Xiong, X., J.L. Smith, and M.S. Chen, *Effect of incorporation of cidofovir into DNA by human cytomegalovirus DNA polymerase on DNA elongation*. Antimicrob Agents Chemother, 1997. **41**(3): p. 594-9.
138. Moore, M.R., et al., *Activity of (S)-1-(3-hydroxy-2-phosphonylmethoxypropyl) cytosine against human cytomegalovirus when administered as single-bolus dose and continuous infusion in in vitro cell culture perfusion system*. Antimicrob Agents Chemother, 1994. **38**(10): p. 2404-8.
139. Tchesnokov, E.P., et al., *Role of helix P of the human cytomegalovirus DNA polymerase in resistance and hypersusceptibility to the antiviral drug foscarnet*. J Virol, 2006. **80**(3): p. 1440-50.
140. Chrisp, P. and S.P. Clissold, *Foscarnet. A review of its antiviral activity, pharmacokinetic properties and therapeutic use in immunocompromised patients with cytomegalovirus retinitis*. Drugs, 1991. **41**(1): p. 104-29.
141. Kim, E.S., *Letemovir: First Global Approval*. Drugs, 2018. **78**(1): p. 147-152.
142. Marschall, M., et al., *In vitro evaluation of the activities of the novel anticytomegalovirus compound AIC246 (letermovir) against herpesviruses and other human pathogenic viruses*. Antimicrob Agents Chemother, 2012. **56**(2): p. 1135-7.
143. Frange, P. and M. Leruez-Ville, *Maribavir, brincidofovir and letermovir: Efficacy and safety of new antiviral drugs for treating cytomegalovirus infections*. Med Mal Infect, 2018. **48**(8): p. 495-502.
144. Chou, S., M. Hakki, and S. Villano, *Effects on maribavir susceptibility of cytomegalovirus UL97 kinase ATP binding region mutations detected after drug exposure in vitro and in vivo*. Antiviral Res, 2012. **95**(2): p. 88-92.
145. Prichard, M.N., et al., *A recombinant human cytomegalovirus with a large deletion in UL97 has a severe replication deficiency*. J Virol, 1999. **73**(7): p. 5663-70.
146. Krosky, P.M., M.C. Baek, and D.M. Coen, *The human cytomegalovirus UL97 protein kinase, an antiviral drug target, is required at the stage of nuclear egress*. J Virol, 2003. **77**(2): p. 905-14.
147. Bigley, T.M., J.M. Reitsma, and S.S. Terhune, *Antagonistic Relationship between Human Cytomegalovirus pUL27 and pUL97 Activities during Infection*. J Virol, 2015. **89**(20): p. 10230-46.
148. Piret, J. and G. Boivin, *Clinical development of letermovir and maribavir: Overview of human cytomegalovirus drug resistance*. Antiviral Res, 2019. **163**: p. 91-105.
149. Prichard, M.N., et al., *Synthesis and antiviral activities of methylenecyclopropane analogs with 6-alkoxy and 6-alkylthio substitutions that exhibit broad-spectrum antiviral activity against human herpesviruses*. Antimicrob Agents Chemother, 2013. **57**(8): p. 3518-27.
150. Kaul, D.R., et al., *First report of successful treatment of multidrug-resistant cytomegalovirus disease with the novel anti-CMV compound AIC246*. Am J Transplant, 2011. **11**(5): p. 1079-84.

151. Kern, E.R., et al., *In vitro activity and mechanism of action of methylenecyclopropane analogs of nucleosides against herpesvirus replication*. *Antimicrob Agents Chemother*, 2005. **49**(3): p. 1039-45.
152. Gentry, B.G., et al., *Stereoselective phosphorylation of cyclopropavir by pUL97 and competitive inhibition by maribavir*. *Antimicrob Agents Chemother*, 2010. **54**(8): p. 3093-8.
153. Chou, S. and T.L. Bowlin, *Cytomegalovirus UL97 mutations affecting cyclopropavir and ganciclovir susceptibility*. *Antimicrob Agents Chemother*, 2011. **55**(1): p. 382-4.
154. Chou, S., G. Marousek, and T.L. Bowlin, *Cyclopropavir susceptibility of cytomegalovirus DNA polymerase mutants selected after antiviral drug exposure*. *Antimicrob Agents Chemother*, 2012. **56**(1): p. 197-201.
155. Chemaly, R.F., et al., *In vitro comparison of currently available and investigational antiviral agents against pathogenic human double-stranded DNA viruses: A systematic literature review*. *Antiviral Res*, 2019. **163**: p. 50-58.
156. Hostetler, K.Y., *Synthesis and early development of hexadecyloxypropylcidofovir: an oral antipoxvirus nucleoside phosphonate*. *Viruses*, 2010. **2**(10): p. 2213-25.
157. Lanier, E.R., et al., *Analysis of mutations in the gene encoding cytomegalovirus DNA polymerase in a phase 2 clinical trial of brincidofovir prophylaxis*. *J Infect Dis*, 2016. **214**(1): p. 32-5.
158. Tajpara, P., et al., *A Preclinical Model for Studying Herpes Simplex Virus Infection*. *J Invest Dermatol*, 2019. **139**(3): p. 673-682.
159. Kawashima, M., et al., *Amenamevir, a novel helicase-primase inhibitor, for treatment of herpes zoster: A randomized, double-blind, valaciclovir-controlled phase 3 study*. *J Dermatol*, 2017. **44**(11): p. 1219-1227.
160. Quenelle, D.C., et al., *Efficacy of pritelivir and acyclovir in the treatment of herpes simplex virus infections in a mouse model of herpes simplex encephalitis*. *Antiviral Res*, 2018. **149**: p. 1-6.
161. Breedveld, F.C. and J.M. Dayer, *Leflunomide: mode of action in the treatment of rheumatoid arthritis*. *Ann Rheum Dis*, 2000. **59**(11): p. 841-9.
162. Chong, A.S., et al., *In vivo activity of leflunomide: pharmacokinetic analyses and mechanism of immunosuppression*. *Transplantation*, 1999. **68**(1): p. 100-9.
163. Waldman, W.J., et al., *Inhibition of cytomegalovirus in vitro and in vivo by the experimental immunosuppressive agent leflunomide*. *Intervirology*, 1999. **42**(5-6): p. 412-8.
164. Rifkin, L.M., et al., *Utility of leflunomide in the treatment of drug resistant cytomegalovirus retinitis*. *Ocul Immunol Inflamm*, 2017. **25**(1): p. 93-96.
165. Ozaki, K.S., et al., *The use of sirolimus in ganciclovir-resistant cytomegalovirus infections in renal transplant recipients*. *Clin Transplant*, 2007. **21**(5): p. 675-80.
166. Kaptein, S.J., et al., *The anti-malaria drug artesunate inhibits replication of cytomegalovirus in vitro and in vivo*. *Antiviral Res*, 2006. **69**(2): p. 60-9.
167. Raffetin, A., et al., *Use of artesunate in non-malarial indications*. *Med Mal Infect*, 2018. **48**(4): p. 238-249.
168. Efferth, T., et al., *The antiviral activities of artemisinin and artesunate*. *Clin Infect Dis*, 2008. **47**(6): p. 804-11.
169. Chou, S., et al., *The unique antiviral activity of artesunate is broadly effective against human cytomegaloviruses including therapy-resistant mutants*. *Antiviral Res*, 2011. **92**(2): p. 364-8.
170. Drouot, E., J. Piret, and G. Boivin, *Artesunate demonstrates in vitro synergism with several antiviral agents against human cytomegalovirus*. *Antivir Ther*, 2016. **21**(6): p. 535-539.
171. Boeckh, M. and L. Corey, *Adoptive Immunotherapy of Viral Infections: Should Infectious Disease Embrace Cellular Immunotherapy?* *J Infect Dis*, 2017. **216**(8): p. 926-928.

172. Pei, X.Y., et al., *Cytomegalovirus-Specific T-Cell Transfer for Refractory Cytomegalovirus Infection After Haploidentical Stem Cell Transplantation: The Quantitative and Qualitative Immune Recovery for Cytomegalovirus*. J Infect Dis, 2017. **216**(8): p. 945-956.
173. Sellar, R.S., et al., *Evidence for clinical activity of artesunate in multidrug-resistant herpes simplex infection following HSCT*. Bone Marrow Transplant, 2012. **47**(11): p. 1482-3.
174. Canivet, C., et al., *Valacyclovir combined with artesunate or rapamycin improves the outcome of herpes simplex virus encephalitis in mice compared to antiviral therapy alone*. Antiviral Res, 2015. **123**: p. 105-13.
175. Littler, E., A.D. Stuart, and M.S. Chee, *Human cytomegalovirus UL97 open reading frame encodes a protein that phosphorylates the antiviral nucleoside analogue ganciclovir*. Nature, 1992. **358**(6382): p. 160-2.
176. Michel, D., et al., *The UL97 gene product of human cytomegalovirus is an early-late protein with a nuclear localization but is not a nucleoside kinase*. J Virol, 1996. **70**(9): p. 6340-6.
177. Talarico, C.L., et al., *Acyclovir is phosphorylated by the human cytomegalovirus UL97 protein*. Antimicrob Agents Chemother, 1999. **43**(8): p. 1941-6.
178. Piret, J., E. Drouot, and G. Boivin, *Antiviral Drug Resistance in Herpesviruses*, in *Handbook of Antimicrobial Resistance*, M. Gotte, et al., Editors. 2014, Springer New York: New York, NY. p. 1-32.
179. Hanks, S.K., A.M. Quinn, and T. Hunter, *The protein kinase family: conserved features and deduced phylogeny of the catalytic domains*. Science, 1988. **241**(4861): p. 42-52.
180. Marschall, M., et al., *Inhibitors of human cytomegalovirus replication drastically reduce the activity of the viral protein kinase pUL97*. J Gen Virol, 2001. **82**(Pt 6): p. 1439-50.
181. Lurain, N.S. and S. Chou, *Antiviral drug resistance of human cytomegalovirus*. Clin Microbiol Rev, 2010. **23**(4): p. 689-712.
182. Komatsu, T.E., et al., *Resistance of human cytomegalovirus to ganciclovir/valganciclovir: a comprehensive review of putative resistance pathways*. Antiviral Res, 2014. **101**: p. 12-25.
183. Piret, J. and G. Boivin, *Antiviral drug resistance in herpesviruses other than cytomegalovirus*. Rev Med Virol, 2014. **24**(3): p. 186-218.
184. Boutolleau, D., S. Burrel, and H. Agut, *Genotypic characterization of human cytomegalovirus UL97 phosphotransferase natural polymorphism in the era of ganciclovir and maribavir*. Antiviral Res, 2011. **91**(1): p. 32-5.
185. Huang, L., et al., *The enzymological basis for resistance of herpesvirus DNA polymerase mutants to acyclovir: relationship to the structure of alpha-like DNA polymerases*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1999. **96**(2): p. 447-52.
186. Chou, S., et al., *Viral DNA polymerase mutations associated with drug resistance in human cytomegalovirus*. J Infect Dis, 2003. **188**(1): p. 32-9.
187. Piret, J., et al., *Contrasting effects of W781V and W780V mutations in helix N of herpes simplex virus 1 and human cytomegalovirus DNA polymerases on antiviral drug susceptibility*. J Virol, 2015. **89**(8): p. 4636-44.
188. Zahn, K.E., et al., *Phosphonoformic acid inhibits viral replication by trapping the closed form of the DNA polymerase*. J Biol Chem, 2011. **286**(28): p. 25246-55.
189. Chou, S., *Foscarnet resistance mutations mapping to atypical domains of the cytomegalovirus DNA polymerase gene*. Antiviral Res, 2017. **138**: p. 57-60.
190. Lischka, P., D. Michel, and H. Zimmermann, *Characterization of cytomegalovirus breakthrough events in a phase 2 prophylaxis trial of letermovir (AIC246, MK 8228)*. J Infect Dis, 2016. **213**(1): p. 23-30.
191. Topalis, D., et al., *Distribution and effects of amino acid changes in drug-resistant α and β herpesviruses DNA polymerase*. Nucleic Acids Res, 2016. **44**(20): p. 9530-9554.

192. Piret, J. and G. Boivin, *Herpesvirus Resistance to Antiviral Drugs*, in *Antimicrobial Drug Resistance: Clinical and Epidemiological Aspects, Volume 2*, D.L. Mayers, et al., Editors. 2017, Springer International Publishing: Cham. p. 1185-1211.
193. Chevillotte, M., et al., *A new tool linking human cytomegalovirus drug resistance mutations to resistance phenotypes*. *Antiviral Res*, 2010. **85**(2): p. 318-27.
194. Drouot, E., J. Piret, and G. Boivin, *Novel method based on "en passant" mutagenesis coupled with a Gaussia luciferase reporter assay for studying the combined effects of human cytomegalovirus mutations*. *J Clin Microbiol*, 2013. **51**(10): p. 3216-24.
195. Bestman-Smith, J. and G. Boivin, *Drug resistance patterns of recombinant herpes simplex virus DNA polymerase mutants generated with a set of overlapping cosmids and plasmids*. *J Virol*, 2003. **77**(14): p. 7820-9.
196. Landry, M.L., et al., *A standardized plaque reduction assay for determination of drug susceptibilities of cytomegalovirus clinical isolates*. *Antimicrob Agents Chemother*, 2000. **44**(3): p. 688-92.
197. Piret, J., N. Goyette, and G. Boivin, *Novel Method Based on Real-Time Cell Analysis for Drug Susceptibility Testing of Herpes Simplex Virus and Human Cytomegalovirus*. *J Clin Microbiol*, 2016. **54**(8): p. 2120-7.
198. Wang, J., et al., *Crystal structure of a pol alpha family replication DNA polymerase from bacteriophage RB69*. *Cell*, 1997. **89**(7): p. 1087-99.
199. Shamoo, Y. and T.A. Steitz, *Building a replisome from interacting pieces: sliding clamp complexed to a peptide from DNA polymerase and a polymerase editing complex*. *Cell*, 1999. **99**(2): p. 155-66.
200. Franklin, M.C., J. Wang, and T.A. Steitz, *Structure of the replicating complex of a pol alpha family DNA polymerase*. *Cell*, 2001. **105**(5): p. 657-67.
201. Tchesnokov, E.P., et al., *Engineering of a chimeric RB69 DNA polymerase sensitive to drugs targeting the cytomegalovirus enzyme*. *J Biol Chem*, 2009. **284**(39): p. 26439-46.
202. Shi, R., et al., *Three-dimensional modeling of cytomegalovirus DNA polymerase and preliminary analysis of drug resistance*. *Proteins*, 2006. **64**(2): p. 301-7.
203. Liu, S., et al., *Crystal structure of the herpes simplex virus I DNA polymerase*. *J Biol Chem*, 2006. **281**(26): p. 18193-200.
204. Martin, M., et al., *Opposite effect of two cytomegalovirus DNA polymerase mutations on replicative capacity and polymerase activity*. *Antivir Ther*, 2010. **15**(4): p. 579-86.
205. Baldanti, F., et al., *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*, 1996. **70**(3): p. 1390-5.
206. Cihlar, T., M.D. Fuller, and J.M. Cherrington, *Characterization of drug resistance-associated mutations in the human cytomegalovirus DNA polymerase gene by using recombinant mutant viruses generated from overlapping DNA fragments*. *J Virol*, 1998. **72**(7): p. 5927-36.
207. Merigan, T.C. and S. Resta, *Cytomegalovirus: where have we been and where are we going?* *Rev Infect Dis*, 1990. **12 Suppl 7**: p. S693-700.
208. Chou, S., *Advances in the genotypic diagnosis of cytomegalovirus antiviral drug resistance*. *Antiviral Res*, 2020: p. 104711.
209. Cihlar, T., et al., *A point mutation in the human cytomegalovirus DNA polymerase gene selected in vitro by cidofovir confers a slow replication phenotype in cell culture*. *Virology*, 1998. **248**(2): p. 382-93.
210. Terrell, S.L. and D.M. Coen, *The pre-NH(2)-terminal domain of the herpes simplex virus I DNA polymerase catalytic subunit is required for efficient viral replication*. *J Virol*, 2012. **86**(20): p. 11057-65.

211. Terrell, S.L., J.M. Pesola, and D.M. Coen, *Roles of conserved residues within the pre-NH2-terminal domain of herpes simplex virus 1 DNA polymerase in replication and latency in mice*. J Gen Virol, 2014. **95**(Pt 4): p. 940-947.
212. Chen, H., G.P. Beardsley, and D.M. Coen, *Mechanism of ganciclovir-induced chain termination revealed by resistant viral polymerase mutants with reduced exonuclease activity*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2014. **111**(49): p. 17462-7.
213. Smith, R.A., D.J. Anderson, and B.D. Preston, *Hypersusceptibility to substrate analogs conferred by mutations in human immunodeficiency virus type 1 reverse transcriptase*. J Virol, 2006. **80**(14): p. 7169-78.
214. Chou, S., et al., *Phenotypic evaluation of previously uncharacterized cytomegalovirus DNA polymerase sequence variants detected in a valganciclovir treatment trial*. J Infect Dis, 2014. **209**(8): p. 1219-26.
215. Mousavi-Jazi, M., et al., *Point mutations induced by foscarnet (PFA) in the human cytomegalovirus DNA polymerase*. J Clin Virol, 2003. **26**(3): p. 301-6.
216. Corley, M., M.C. Burns, and G.W. Yeo, *How RNA-Binding Proteins Interact with RNA: Molecules and Mechanisms*. Mol Cell, 2020. **78**(1): p. 9-29.
217. Bennett, N. and M. Gotte, *Utility of the bacteriophage RB69 polymerase gp43 as a surrogate enzyme for herpesvirus orthologs*. Viruses, 2013. **5**(1): p. 54-86.
218. Lawler, J.L., P. Mukherjee, and D.M. Coen, *Herpes Simplex Virus 1 DNA Polymerase RNase H Activity Acts in a 3'-to-5' Direction and Is Dependent on the 3'-to-5' Exonuclease Active Site*. J Virol, 2018. **92**(5).
219. Marfori, J.E., et al., *Development of new cytomegalovirus UL97 and DNA polymerase mutations conferring drug resistance after valganciclovir therapy in allogeneic stem cell recipients*. J Clin Virol, 2007. **38**(2): p. 120-5.
220. Chou, S., et al., *Improved detection of emerging drug-resistant mutant cytomegalovirus subpopulations by deep sequencing*. Antimicrob Agents Chemother, 2014. **58**(8): p. 4697-702.
221. Lionta, E., et al., *Structure-based virtual screening for drug discovery: principles, applications and recent advances*. Curr Top Med Chem, 2014. **14**(16): p. 1923-38.
222. Thibaut, H.J., A.M. De Palma, and J. Neyts, *Combating enterovirus replication: state-of-the-art on antiviral research*. Biochem Pharmacol, 2012. **83**(2): p. 185-92.
223. Ledford, R.M., M.S. Collett, and D.C. Pevear, *Insights into the genetic basis for natural phenotypic resistance of human rhinoviruses to pleconaril*. Antiviral Res, 2005. **68**(3): p. 135-8.
224. Menéndez-Arias, L. and F. Gago, *Antiviral agents: structural basis of action and rational design*. Subcell Biochem, 2013. **68**: p. 599-630.
225. Kistler, A.L., et al., *Genome-wide diversity and selective pressure in the human rhinovirus*. Virol J, 2007. **4**: p. 40.
226. Yan, Z., et al., *HIV integrase inhibitors block replication of alpha-, beta-, and gammaherpesviruses*. mBio, 2014. **5**(4): p. e01318-14.
227. Mercorelli, B., G. Palù, and A. Loregian, *Drug Repurposing for Viral Infectious Diseases: How Far Are We?* Trends Microbiol, 2018. **26**(10): p. 865-876.
228. Mason, S., et al., *Comparison of antiviral resistance across acute and chronic viral infections*. Antiviral Res, 2018. **158**: p. 103-112.
229. Chou, S., *Rapid in vitro evolution of human cytomegalovirus UL56 mutations that confer letermovir resistance*. Antimicrob Agents Chemother, 2015. **59**(10): p. 6588-93.
230. Wildum, S., H. Zimmermann, and P. Lischka, *In vitro drug combination studies of Letermovir (AIC246, MK-8228) with approved anti-human cytomegalovirus (HCMV) and anti-HIV compounds in inhibition of HCMV and HIV replication*. Antimicrob Agents Chemother, 2015. **59**(6): p. 3140-8.

231. Chambers, A.C., et al., *Overview of the Baculovirus Expression System*. *Curr Protoc Protein Sci*, 2018. **91**: p. 5.4.1-5.4.6.
232. Malaby, A.W., et al., *Expression and Structural Analyses of Human DNA Polymerase θ (POLQ)*. *Methods Enzymol*, 2017. **592**: p. 103-121.

Annexe A : Article supplémentaire

Au cours de ma première année de doctorat j'ai eu la possibilité d'écrire une revue avec Dre Jocelyne Piret et Dr Guy Boivin. Cette revue porte sur les ADN polymérase des virus herpétiques (CMV et VHS-1) et fait le point de la littérature sur leur structure, leurs inhibiteurs ainsi que sur leur résistance aux antiviraux. Cette revue a été publiée dans « *Virus Research* » en 2017.

Title Page

Herpesvirus DNA Polymerases: Structures, Functions and Inhibitors

Running head: Herpesvirus DNA polymerases

Karima Zarrouk, Jocelyne Piret and Guy Boivin*

Research center in infectious diseases, CHU de Québec and Laval University
Quebec City, Quebec, Canada

Summary word count: 248

Text word count: 8 044

Reference word count: 6 351 (212 references)

Tables: 2

Figures: 7

***, Corresponding author:**

Dr Guy Boivin

Centre de recherche en infectiologie

CHU de Québec- Université Laval

2705, Blvd Laurier, R-709

Québec (Québec)

Canada, G1V 4G2

E-mail: Guy.Boivin@crhudequebec.ulaval.ca

Abstract

Human herpesviruses are large double-stranded DNA viruses belonging to the Herpesviridae family. These viruses have the ability to establish lifelong latency into the host and to periodically reactivate. Primary infections and reactivations of herpesviruses cause a large spectrum of diseases and may lead to severe complications in immunocompromised patients. The viral DNA polymerase is a key enzyme in the lytic phase of the infection by herpesviruses. This review focuses on the structures and functions of viral DNA polymerases of herpes simplex virus (HSV) and human cytomegalovirus (HCMV). DNA polymerases of HSV (UL30) and HCMV (UL54) belong to B family DNA polymerases with which they share seven regions of homology numbered I to VII as well as a δ -region C which is homologous to DNA polymerases δ . These DNA polymerases are multi-functional enzymes exhibiting polymerase, 3'-5' exonuclease proofreading and ribonuclease H activities. Furthermore, UL30 and UL54 DNA polymerases form a complex with UL42 and UL44 processivity factors, respectively. The mechanisms involved in their polymerisation activity have been elucidated based on structural analyses of the DNA polymerase of bacteriophage RB69 crystallized under different conformations, i.e. the enzyme alone or in complex with DNA and with both DNA and incoming nucleotide. All antiviral agents currently used for the prevention or treatment of HSV and HCMV infections target the viral DNA polymerases. However, long-term administration of these antivirals may lead to the emergence of drug-resistant isolates harboring mutations in genes encoding viral enzymes that phosphorylate drugs (i.e., nucleoside analogues) and/or DNA polymerases.

Keywords: DNA polymerase, herpesviruses, DNA replication, structure, functions, antiviral agents, antiviral drug resistance

Abbreviations:

ACV, acyclovir; CDV, cidofovir; dGTP, deoxyguanosine triphosphate; dNTP, deoxynucleotide triphosphate; E, early; EBV, Epstein-Barr virus; FOS, foscarnet; GCV, ganciclovir; gB/D, glycoprotein B/D; HCMV, human cytomegalovirus; HHV, human herpes virus; HIV, human immunodeficiency virus; HP, helicase-primase; HSV, herpes simplex virus; ICP, infected cell protein; IE, immediate-early; kbp, kilo base pairs; L, late; LATs, late-associated transcripts; LUNA, latency unique natural antigen; MIEP, major immediate-early promotor; miRNA, microRNA; ND10, nuclear domain 10; ORF, open reading frame; PCV, penciclovir; PML, promyelocytic leukemia protein; pp, phosphoprotein; RNase, ribonuclease; RT, reverse transcriptase; α -TIF, α -trans-inducing factor; TK, thymidine kinase; UL, unique long; US, unique short; VP, virion protein; VZV, varicella-zoster virus.

1. Introduction

Herpesviruses are large DNA viruses with a size varying from 120 to as much as 260 nm (Pellet and Roizman, 2013). The virion is composed of four elements which consist from the inner to outer parts of: (a) an electron dense core containing the linear double-stranded DNA; (b) a highly stable icosahedral capsid made of 162 capsomeres; (c) a largely unstructured proteinaceous layer called the tegument; and (d) an outer lipid layer envelope derived from the host cell membrane and containing viral glycoproteins that are involved in attachment and entry into cells.

The *Herpesviridae* family is divided into three subfamilies composed of nine human viruses (Adams and Carstens, 2012). The Alphaherpesvirinae subfamily is composed of herpes simplex virus 1 and 2 (HSV-1 and HSV-2) and varicella-zoster virus (VZV). Human cytomegalovirus (HCMV) and human herpes viruses 6A, 6B and 7 (HHV-6A, HHV-6B and HHV-7) belong to the Betaherpesvirinae subfamily. The third subfamily, the Gammaherpesvirinae, is composed of Epstein-Barr virus (EBV) and human herpes virus 8 (HHV-8). The particularity of herpesviruses resides in their capacity to persist for life in a latent state into the host and to reactivate under certain circumstances. Primary infections and reactivations of herpesviruses can cause a large spectrum of diseases, some of which can be fatal in immunocompromised patients. HSV-1 and HSV-2 can cause orolabial and genital infections as well as keratitis, encephalitis and neonatal infections (Fatahzadeh and Schwartz, 2007). HSV infections may be severe in immunocompromised patients, particularly those with defects in cell-mediated immunity. In patients with human immunodeficiency virus (HIV) infection and in recipients of solid organ or bone marrow transplants, herpetic lesions can be extensive, tend to persist for longer time periods and have the potential to disseminate. Recurrences tend to be more frequent and may be atypical in appearance. In addition to persistent mucocutaneous lesions, HSV can also lead to disseminated visceral infections, such as esophagitis, hepatitis and pneumonia as well as meningoencephalitis. VZV is the causative agent of varicella and herpes zoster (Gershon and Gershon, 2013). HCMV is responsible for mononucleosis-like syndromes as well as systemic and organ-specific diseases (e.g., pneumonitis, gastrointestinal lesions, hepatitis, retinitis, pancreatitis, myocarditis, encephalitis and peripheral neuropathy) in immunocompromised patients (Steininger, 2007). In this setting, infection is either due to reactivation of latent virus or caused by reinfection or primary infection with infected tissues and organs. HCMV infections in immunocompromised patients are severe and life-threatening. Infections with HHV-6B, and more rarely HHV-7, result in exanthem subitum in infants whereas primary infections with HHV-6A are generally asymptomatic (Agut et al., 2016). HHV-6B and HHV-7 are also associated with severe diseases (e.g., encephalitis and pneumonitis) in immunocompromised patients. EBV is associated with infectious mononucleosis,

nasopharyngeal carcinoma, Burkitt's lymphoma, non-Hodgkin B-cell lymphomas and post-transplant lymphoproliferative diseases (Jha et al., 2016). Finally, HHV-8 is mainly associated with Kaposi's sarcoma, one of the most frequently encountered neoplasms in HIV-infected patients (Dittmer and Damania, 2016).

The viral DNA polymerase is a key enzyme in the lytic phase of infection by herpesviruses to ensure the replication of the viral genome. Herpesvirus DNA polymerases are thus attractive targets for the development of potent inhibitors. In fact, all antiviral agents currently approved for the prevention or treatment of HSV and HCMV infections are inhibitors of the viral DNA polymerases (Andrei et al., 2009). However, long-term administration of these antiviral agents may lead to the development of infections caused by viral isolates with reduced drug susceptibility. Mutations that arise in genes encoding viral enzymes that phosphorylate drugs (i.e., nucleoside analogues) and/or viral DNA polymerases have been reported to confer drug resistance (Lurain and Chou, 2010; Piret and Boivin, 2014). This review will discuss the structures and functions of HSV and HCMV DNA polymerases and their implications in the viral replication process. The antiviral agents that target these viral DNA polymerases and the mechanisms involved in drug resistance will be also described.

2. Organization of HSV and HCMV genomes

The HSV genome is composed of 150 kbp encoding 90 unique transcriptional units, of which 84 encode proteins (Roizman et al., 2013). Among herpesviruses, HCMV has the largest genome with 236 kbp encoding 167 proteins (Mocarski et al., 2013). Viral proteins have been named based on serial numbering of virion proteins on a gel (VP; HSV), the open reading frame (ORF) encoding them (e.g., UL; HSV and HCMV) or as infected cell proteins (ICP; HSV) (Pellet and Roizman, 2013).

Herpesviruses are divided into six genetic groups (A, B, C, D, E and F) depending on their genome organization (Davison, 2007). Both HSV and HCMV belong to genetic group E that is characterized by a long segment (L) composed of unique long (UL) sequences bordered by «anb» repeats and a short segment (S) composed of unique short (US) sequences bordered by «can» repeats as well as a junction between L and S segments composed of «b'a'mc'» inverted repeats (Demarchi, 1981; Roizman, 1979; Sheldrick and Berthelot, 1975) (Fig. 1). The genome of HSV has two copies of an origin of replication, called oriS, located in the «c» and «c'» elements of the US sequence and another one, called oriL, located between *UL29* and *UL30* genes in the UL sequence (Boehmer and Nimonkar, 2003; Weller et al., 1985). In contrast to HSV, the HCMV genome contains only one cis-acting site that can act as an origin of lytic DNA replication, called

oriLyt, localized between *UL57* and *UL69* genes in the UL sequence (Anders et al., 1992; Masse et al., 1992; Zhu et al., 1998). The oriLyt sequence in HCMV is the largest (3,000 bp) and the most structurally complex among human Betaherpesvirinae (Pari, 2008). Two cis-acting signals, *pac1* and *pac2*, which are recognized by the encapsidation machinery to initiate genome cleavage and packaging, are located in each terminal repeated «an» elements (Nasseri and Mocarski, 1988). Furthermore, recombination between the terminal repeats and the internal inverted repeats (in particular between the «an» and «a'm» elements) leads to the inversion of the UL and US sequences which results in the formation of four equimolar viral isomers during replication (Hayward et al., 1975). This process is dispensable for viral replication since a HCMV mutant with a deletion of internal repeats replicates as efficiently as the wild-type virus in the absence of viral genome isomerization (Sauer et al., 2010). Thus, the importance of genome isomerization for herpesviruses remains to be elucidated.

3. Gene expression during HSV and HCMV replication

Gene expression in herpesviruses is sequential as a result of transcriptional and post-transcriptional regulations. There are three general kinetic classes of genes designated α , β and γ that are also respectively called immediate-early (IE), early (E) and late (L) genes (Hones and Roizman, 1974). The α -genes are transcribed in the absence of de novo viral protein synthesis. For HSV, the expression of α -genes is stimulated by the protein VP16 (α -trans-inducing factor; α -TIF), already present in virion tegument (Batterson and Roizman, 1983; Campbell et al., 1984). For HCMV, the major IE genes are transcribed under the control of the major immediate-early promoter (MIEP) which requires the activity of proteins of the tegument, pp71 and pp69, brought by the virus (Stinski and Isomura, 2008). Products of α -genes perform a number of regulatory functions including modulation of cell cycle, remodeling of chromatin structure, RNA transport and splicing as well as activation of β -genes transcription. There are two subclasses of β -genes, called $\beta 1$ (early-early) and $\beta 2$ (early-late), that are sequentially expressed (Mocarsky, 2007). The β -gene products are involved in genome replication and include DNA-binding proteins and enzymes that ensure adequate pools of nucleotides and viral DNA synthesis. The genome of HSV encodes seven proteins essential for the viral DNA replication namely the UL9 origin binding protein, ICP8 single-stranded DNA-binding protein encoded by the *UL29* gene, DNA polymerase-processivity factor complex respectively encoded by *UL30* and *UL42* genes and the helicase-primase complex encoded by *UL5*, *UL8* and *UL52* genes (Roizman et al., 2013; Weller and Coen, 2012). For HCMV, six proteins involved in viral DNA replication are encoded by β -gene products namely the single-stranded DNA-binding protein encoded by *UL57* gene, DNA polymerase

encoded by *UL54* gene, its processivity factor encoded by *UL44* gene and the heterotrimeric helicase-primase complex formed by HP1 (primase), HP2 (primase-associated factor) and HP3 (helicase) proteins encoded respectively by *UL105*, *UL70* and *UL102* genes (Mocarski et al., 2013; Pari, 2008). The expression of γ -genes is enhanced by β -gene products. The expression of α - and β -genes is turned off by the products of γ -genes late during infection. The γ -genes are composed of two kinetic subclasses, namely γ_1 and γ_2 , also called leaky late and true late genes, respectively (Mocarsky, 2007). Contrarily to leaky late genes, the expression of true late genes is dependent on active viral DNA synthesis. The γ -genes mainly encode viral structural proteins essential for the maturation and assembly of new viral particles such as the glycoproteins gB and gD.

4. Mechanisms of HSV and HCMV genomic replication

During the lytic cycle, the transcription and replication of viral genome as well as the assembly of new capsids take place in the nucleus. The linear HSV and HCMV genomes enter the nucleus where they circularise quickly and localize near the nuclear lamina (Boehmer and Nimonkar, 2003). The viral DNA associates with histones, histone- and chromatin-modifying enzymes and repressors as well as the host nuclear domain 10 [ND10; also called promyelocytic leukemia protein (PML) bodies] (Burkham et al., 2001; Everett, 2001; Sourvinos and Everett, 2002). Immediate-early proteins modulate cell intrinsic signaling, inhibit the DNA damage response, induce cell cycle arrest, allow chromatin remodeling and direct regulation of gene expression (Hofmann et al., 2002; Lukashchuk et al., 2008). The viral DNA serves as a template for transcription and replication (Becker et al., 1968). The cellular RNA polymerase II and associated transcription machinery transcribe viral genes into transcript products that are 3'-polyadenylated and 5'-capped (Beck and Millette, 1982). All viral proteins are synthesized in the cytoplasm in host cell ribosomes and processed by the use of cellular enzymes and pathways, but some enzymes such as proteases are also encoded by the virus.

For HSV, proteins implicated in viral genome replication are recruited at pre-replicative sites containing the viral DNA in the nucleus (de Bruyn and Knipe, 1988; Quinlan et al., 1984). Pre-replicative sites grow into replication compartments as DNA replication proceeds. The initiation of DNA replication begins with the binding of homodimer of UL9 origin binding protein to the specific CGTTCGCACTT sequence of oriL or oriS in the viral genome and forms the viral replication complex (Fig. 2) (Roizman et al., 2013). It has been reported that the UL9 protein exhibits ATPase and helicase activities (Fierer and Challberg, 1992). The replication origin is distorted by the action of UL9 which begins to unwind the DNA. The ICP8 single-stranded DNA-binding protein binds to the viral replication complex and enhances UL9 helicase activity to unwind

the DNA at the origin of replication (Boehmer et al., 1993). The helicase-primase complex is then recruited by interactions with UL9 and/or ICP8. In the helicase-primase complex, UL5 and UL52 exhibit DNA-dependent ATPase, primase and helicase activities (Chen et al., 2005) whereas UL8 interacts with other components of the replication machinery and also possibly coordinates replication fork progress. The UL30 DNA polymerase and associated UL42 processivity factor are then recruited to the viral replication complex (Carrington-Lawrence and Weller, 2003) through an interaction between UL30 enzyme and the C-terminus of UL8 (Liu et al., 2006; Marsden et al., 1997). The helicase-primase complex unwinds the viral genomic DNA and synthesizes the primer from which the UL30-UL42 complex will synthesize the leading strand (Cavanaugh and Kuchta, 2009; Falkenberg et al., 2000). Both the helicase-primase complex and UL30-UL42 assemble at each replication forks to initiate the viral DNA replication by a theta mode (Boehmer and Lehman, 1997). The UL9-dependent theta replication mode is converted to a UL9-independent rolling circle mechanism which becomes predominant during viral replication (Skaliter et al., 1996). The transition between the theta mode and the rolling circle mechanism is not yet elucidated. Several viral accessory proteins also play a role in viral DNA replication such as the thymidine kinase encoded by *UL23* gene, uracil DNA glycosylase encoded by *UL2* gene, deoxyuridine triphosphatase encoded by *UL50* gene, alkaline reductase encoded by *UL12* gene and the ribonucleotide reductase complex encoded by *UL39* and *UL40* genes (Roizman et al., 2013; Weller and Coen, 2012). Furthermore, host cell proteins are presumably implicated during HSV replication such as the DNA polymerase α -primase, DNA ligase and topoisomerase II (Boehmer and Lehman, 1997).

The initiation of HCMV genome replication is not well understood. It is suggested that initiation of viral DNA synthesis requires oriLyt promoter activity which is dependent on the complex formed by homomultimers of UL84 and the key regulatory IE2-p86 heterodimer (Sarisky and Hayward, 1996; Xu et al., 2004). UL84 recruits UL54-UL44 complex through its interaction with the processivity factor (Kim and Ahn, 2010). All four phosphoproteins encoded by UL112-113 (namely, pp34, pp43, pp50 and pp84) associate with pre-replicative sites near ND10 to coordinate assembly of the viral replisome (Ahn et al., 1999; Penfold and Mocarski, 1997). Six core replication fork proteins (UL57 single-stranded DNA-binding protein, the UL54-UL44 complex and the helicase-primase complex) compose the replisome and participate to the synthesis of viral genomic DNA (Mocarski et al., 2013; Pari, 2008) (Fig. 2). The helicase-primase complex unwinds the DNA and UL57 single-stranded DNA-binding protein seems to facilitate strand separation and prevent their reannealing during DNA synthesis (Woon et al., 2008). The UL54-UL44 complex synthesizes the leading strand from the primer initiated by the helicase-primase

complex at the replication forks. The four *UL112-113* gene products, the UL84-IE2-p86 complex and the six replisome proteins remain associated within the replication compartment throughout the remainder of infection (Park et al., 2006). Several viral accessory proteins are also involved in viral DNA replication such as the ribonucleotide reductase encoded by *UL45* gene, deoxyuridine triphosphatase encoded by *UL72* gene, deoxyribonuclease encoded by *UL98* gene and uracil DNA glycosylase encoded by *UL114* gene (Mocarski et al., 2013). Cellular proteins may also participate to the viral DNA replication process such as the RNA-binding protein (e.g., hnRNP-K) and proteins implicated in the stability and structure of chromosomes (e.g., BUB3 and MAPRE1) (Kagele et al., 2009; Kagele et al., 2012). There is limited evidence supporting the idea that HCMV DNA synthesis occurs through a rolling circle mode and the mechanism involved may be more complex (Boehmer and Nimonkar, 2003).

The viral DNA synthesis results in long head-to-tail concatemeric structures containing the four sequence isomers described earlier that appear to be packaged into capsids with an equal efficiency. These concatemers will serve as templates for new cycles of replication or will be cleaved during packaging by the terminase complex. For HSV, UL15, UL28 and UL33 proteins are suggested to form the terminase complex (Beard et al., 2002). The complex of UL15 and UL28 has specific DNA-binding and nuclease activities whereas UL33 may reinforce the interaction between the two proteins (Heming et al., 2014). For HCMV, the terminase complex is composed of UL89, UL56 and UL51 proteins (Borst et al., 2013). It has been suggested that UL56 and UL89 possess nuclease and ATPase activities (Nadal et al., 2010). The terminase complex cleaves concatemeric DNA into monomeric molecules at specific sites that are called DNA packaging signals *pac1* and *pac2* (Bogner et al., 1998; Deiss and Frenkel, 1986). These cis-acting signals are conserved among herpesvirus genomes and are required for the maturation of viral DNA and its packaging into pre-formed capsids (Chou and Roizman, 1989; Wang and McVoy, 2011). The mechanisms of encapsidation of viral DNA is not well understood but it appears that the initiation of packaging starts with the binding of UL28 (HSV) to *pac1* but not *pac2* whereas UL56 (HCMV) binds to both *pac1* and *pac2* (Adelman et al., 2001; Bogner et al., 1998).

In addition to the lytic phase of infection, herpesviruses have the capacity to enter into latency. The latent cycle of HSV takes place into sensory ganglia and neurons (Croen et al., 1987) whereas HCMV establishes its latency in bone marrow resident CD34+ progenitor cells of the myeloid lineage as well as in their derivative CD14+ monocytes in peripheral blood (Poole and Sinclair, 2015). The viral genome persists in an episomal form and does not integrate into the host genome (Mellerick and Fraser, 1987). For HSV, the latency-associated transcripts (LATs), which are localized into the inverted repeats flanking the UL sequence of the viral genome, are the

principal genes expressed during the latent cycle whereas the expression of lytic genes is downregulated (Perng and Jones, 2010). For HCMV, the latency and reactivation seem to be controlled by host cell gene repression and activation that may be associated with differentiation signals such as cytokines and growth factors (Sinclair and Reeves, 2013). The latency phase is associated with a gradual shut-down of viral gene expression along with sustained levels of latency-associated transcripts such as LAcml-10 (Jenkins et al., 2008), UL138 (Goodrum et al., 2007), ORF94 (Tan et al., 2011) and latency unique natural antigen (LUNA) (Bego et al., 2011). It is also suggested that cellular miRNA and non-coding RNAs are implicated in the latent phase of infection by HCMV (O'Connor et al., 2014). HSV and HCMV can reactivate following varying stress conditions (such as fever, exposition to UV light,...) and immunosuppression. The reactivation of HSV involves the stimulation of lytic genes expression whereas the transcription of LATs is shut-down (Perng and Jones, 2010). The reactivation of HCMV may result from the differentiation of progenitor myeloid cells into terminally differentiated dendritic cells or macrophages (Huang et al., 2012). Alterations of repressive chromatin structure around the MIEP is associated with transcriptional activation that induces viral lytic IE gene expression and production of infectious virus in these cells (Poole and Sinclair, 2015).

5. HSV and HCMV DNA polymerases

The HSV and HCMV DNA polymerases are multi-functional enzymes (1,235 and 1,242 amino acids for UL30 and UL54, respectively) (Heilbronn et al., 1987; Tsurumi et al., 1987) which possess a polymerase activity for extension of DNA primer chains (Lehman and Boehmer, 1999; Nishiyama et al., 1983), an intrinsic 3'-5' exonuclease activity that removes the mismatched nucleotide from the primer DNA strand (Knopf, 1979; Nishiyama et al., 1983) as well as a ribonuclease (RNase) H activity (Crute and Lehman, 1989). In addition, the carboxyl terminal region of the UL30/UL54 catalytic subunit interacts with the UL42/UL44 accessory protein which enhances the processivity of DNA replication (Digard et al., 1993; Gottlieb et al., 1990; Loregian et al., 2004; Weisshart et al., 1994).

Seven families of DNA polymerases [A, B, C, D, X, Y and reverse transcriptase (RT)] have been proposed based on sequence and structural homologies (Braithwaite and Ito, 1993). Herpesvirus DNA polymerases belong to the B family also called α -like DNA polymerases which contains the eukaryotic polymerases α , δ , ζ and ϵ , and which also includes some fungal, plant, bacteriophage and other viral DNA polymerases (Koonin, 2006; Wong et al., 1988). B family DNA polymerases often possess a proofreading activity and are associated with a processivity factor making these enzymes highly accurate and processive (Koonin, 2006). Unlike other polymerase

families, B family DNA polymerases associate with other proteins involved in genome replication to form a multi-subunit complex sometimes called DNA replisome (Garcia-Diaz and Bebenek, 2007).

Analyses of herpesvirus DNA polymerases sequences reveal seven clusters of residues conserved among all α -like DNA polymerases. These conserved regions are numbered in order of decreased percentage of homology (regions I to VII) (Larder et al., 1987; Wong et al., 1988). Another homology domain, called δ -region C, is shared more specifically by eukaryotic DNA polymerases δ (Zhang et al., 1991). The gp43 DNA polymerase of bacteriophage RB69 was the first enzyme to be crystallized in its apo form (Wang et al., 1997) and subsequently in its editing (Shamoo and Steitz, 1999) and replicating (Franklin et al., 2001) modes. These structures served to perform structural homology analyses with other DNA polymerases α from thermophilic (Rodriguez et al., 2000) and archaeobacteria (Zhao et al., 1999). The UL30 apoenzyme was then successfully crystallized in the open conformation (Liu et al., 2006). Structural models of UL30 DNA polymerase bound to different ligands were then built by superimposing selected domains of the enzyme onto those of editing and replicating complexes of gp43 as well as the other α -like DNA polymerases using homology modeling tools. Due to difficulties to express large amounts of the UL54 DNA polymerase, crystallographic data are not yet available for this protein. Structural models of the open and closed conformations of UL54 DNA polymerase have been generated starting with the sequence of the enzyme of HCMV strain AD169 and superimposing the structures of other DNA polymerases α that have already been solved through X-ray crystallography (Shi et al., 2006). These structural models have been used to evaluate the impact of several clinical mutations detected in UL54 DNA polymerase in conferring antiviral drug resistance.

The crystal structure of UL30 apoenzyme is now considered as a model for herpesvirus DNA polymerases (Liu et al., 2006). The analyses of the crystal structure of UL30 DNA polymerase revealed the presence of five conserved structural domains common to all B family DNA polymerases that include a NH₂-terminal, 3'-5' exonuclease, thumb, fingers and palm domains (Brautigam and Steitz, 1998; Steitz, 1999). An additional domain, called the pre-NH₂-terminal domain, was also demonstrated at the N-terminal end of UL30 DNA polymerase (Liu et al., 2006). It is likely that all human Herpesviridae DNA polymerases contained a pre-NH₂-terminal domain due to the high sequence similarities among these enzymes. These structural domains form a disk-like shape around a central hole, with the NH₂- and C-termini located at opposite sides of the protein (Fig. 3).

As described by Liu et al., the NH₂ domain of UL30 DNA polymerase is formed by three motifs (Liu et al., 2006). The first one contains two β -sheets and a short α -helix, the second one is

formed by a $\beta\alpha\beta\beta\alpha\beta$ fold that was also described in some RNA binding proteins (Burd and Dreyfuss, 1994) and the last motif is composed of two helices. It has been suggested that the NH₂-terminal domain could be the catalytic site of the RNase H activity of the enzyme (Burd and Dreyfuss, 1994; Liu et al., 2006). However, the functional role of this domain remains to be elucidated.

The structure of B family DNA polymerases has been likened to a right hand with palm, thumb and fingers domains (Ollis et al., 1985) providing the catalytic site, the DNA duplex binding and nucleotide substrate binding functions, respectively. The palm domain corresponds to regions VII, I and II which form the catalytic site of UL30 DNA polymerase (Liu et al., 2006). The palm domain is composed of two conserved motifs, DXXLYPS (motif A; region II) and DTDS (motif C; region I), located before and after the fingers domains, respectively (Wang et al., 1997). These two motifs form a three-strand anti-parallel β sheet. The catalytic site contains two metal ions that stabilize the transition state of the α -phosphate of the incoming nucleotide during catalysis. Their coordination is dependent on three highly conserved residues of the palm domain [F718, D717 (both in motif A) and D888 (motif C)] (Fig. 4). Metal A also interacts with the 3'-OH end of the last nucleotide on the primer strand and the α -phosphate of the incoming nucleotide (Brautigam and Steitz, 1998; Steitz, 1999). Metal B interacts with all three phosphates (α , β and γ) of the incoming nucleotide. The KKRY motif is located in the palm domain after motif C and is involved in the stabilization of the interaction between base pairs of the primer and template strands. The fingers domain (regions III and VI) is formed by two long antiparallel α -helices (helices N and P). This domain interacts with the DNA template and contains the binding site of the incoming nucleotide (Wang et al., 1997). Another conserved motif, KXXXNSXYG (motif B; region III), is located on the helix P. The three phosphates of the incoming nucleotide interact with positively-charged side chains from residues R785, R789 and K811 located on helix P (Fig. 4). The thumb domain corresponds to region V and is formed by long α -helices. This domain seems to interact with the DNA duplex.

The precise role of the pre-NH₂-terminal domain of UL30 DNA polymerase has not been established yet (Liu et al., 2006). It is proposed that this domain could interact with the exonuclease domain via its motif FYNPYL which is localized at the NH₂ terminus. The position of the FYNPYL motif also suggests an implication of the pre-NH₂-terminal domain in the interaction with the helicase-primase complex (Lehman and Boehmer, 1999). Furthermore, recent studies showed that a mutant DNA polymerase with a deletion of the pre-NH₂-terminal domain exhibited a reduced viral DNA synthesis even if the polymerase activity was not altered as well as a decreased capacity to establish latency in mice (Terrell and Coen, 2012; Terrell et al., 2014). This suggests that the

pre-NH₂-terminal domain could be involved in protein-protein interaction that contributes to viral DNA synthesis and replication such as the formation of the viral DNA replisome.

The 3'-5' exonuclease domain exhibits three conserved regions, called Exo I, Exo II (region IV) and Exo III (δ -region C), that form the active site (Bernad et al., 1989). All characterized 3'-5' exonuclease domains adopt a RNase-like fold and contain four highly conserved negatively-charged residues that form the active site (Derbyshire et al., 1988). In UL30, these residues are D368, E370 (both in Exo I), D471 (Exo II) and D581 (Exo III) (Liu et al., 2006) whereas in UL54, these residues are D301, E303 (both in Exo I), D413 (Exo II) and D542 (Exo III) (Bennett and Gotte, 2013). These conserved negatively-charged amino acids are required to coordinate the two metal ions that participate to the catalytic reaction (Derbyshire et al., 1988; Hall et al., 1995).

6. Mechanisms of viral DNA replication by UL30 and UL54 DNA polymerases

6.1. Mechanisms of DNA polymerization

Family B DNA polymerases possess a 5'-3' polymerizing activity that consists in the addition of new nucleotides to the 3'-OH end of the primer. Structure analyses of gp43 DNA polymerase of bacteriophage RB69 reveal that the enzyme may adopt three different conformations, the apoenzyme state in the absence of DNA binding (Wang et al., 1997), the editing mode consisting in a binary complex with DNA (Shamoo and Steitz, 1999) and the replicating mode corresponding to a ternary complex with DNA and nucleotide (Franklin et al., 2001) that allowed to elucidate the mechanism of DNA polymerization. The DNA duplex binds to the apoenzyme and causes the thumb to close down around the DNA while the fingers domain remains in an open conformation (Fig. 5). The incorporation of the correct nucleotide, which harbors hydrogen bonds complementary to the template DNA, is favored by the structure of the enzyme-DNA binary complex (Chaudhuri et al., 2003; Hwang et al., 1999). The binding of the incoming nucleotide to the enzyme-DNA binary complex induces a conformational change in the fingers which rotate 60° inwards relative to the palm domain. The closure of the fingers domain moves the residues on helices N (region VI) and P (region III), which are involved in the binding of the triphosphate tail of the incoming nucleotide, closer to the polymerase active site to trap the nucleotide. In B family DNA polymerases, the nucleotidyl transfer occurs by a two divalent ion mechanism (Steitz, 1998) associated with a concurrent two proton transfer reaction (Castro et al., 2007). Metal ion A facilitates a close contact between the 3'-OH of the primer terminus and the α -phosphate of the incoming nucleotide. This reduces the pK_a of the 3'-OH group and allows its deprotonation which induces the nucleophilic attack of the α -phosphate and the formation of the

phosphodiester bond (Fothergill et al., 1995). Furthermore, metal ion B interacts with all three phosphates of the incoming nucleotide which stabilizes the transition state of the catalytic reaction (Xia et al., 2011). After the nucleotidyl transfer onto the 3'-OH end of the primer strand has occurred, the enzyme adopts a pre-translocated state. The pyrophosphate is released, the DNA is translocated and the enzyme adopts a post-translocated state. The fingers move away from the palm domain and helices N and P then initiate close contacts with the NH₂-terminal domain (open conformation). The enzyme may lose its grip on the DNA allowing it to slide down one nucleotide so that it is in position to incorporate the next nucleotide. This resets the polymerase for a next round of catalysis. At the end of DNA synthesis, DNA duplex leaves thumb and palm domains.

6.2. Processivity factors (UL42/UL44)

The UL42 and UL44 processivity factors play an important role in origin-dependent DNA synthesis in HSV and HCMV replication, respectively. For HSV, the UL42 double-stranded DNA-binding protein (488 amino acids) forms a heterodimer by interacting with the C-terminus of UL30 catalytic subunit to increase the processivity of DNA polymerization (Chow and Coen, 1995; Digard et al., 1993; Gottlieb et al., 1990; Parris et al., 1988; Zuccola et al., 2000). Unlike other processivity factors, monomers of UL42 exhibit a high binding affinity for double-stranded and single-stranded DNA (Chow and Coen, 1995; Randell and Coen, 2004; Weisshart et al., 1999). A direct interaction between basic side chains of amino acids of UL42 and negatively-charged phosphate backbone of DNA has been demonstrated (Komazin-Meredith et al., 2008b; Randell et al., 2005). The DNA binding activity seems essential for the processivity function of UL42 since mutant proteins that exhibit a reduced DNA binding demonstrate an impaired synthesis of long-chain DNA (Chow and Coen, 1995; Jiang et al., 2007a; Jiang et al., 2007b). UL42 also prevents a premature dissociation of UL30 catalytic subunit from the template and primer DNA strands by ensuring a correct association between the enzyme and DNA (Weisshart et al., 1999). Using pre-steady state kinetics analysis, it was shown that UL42 increases by 6-fold the affinity of UL30 catalytic subunit for the primer-template whereas the pre-steady state constants for polymerase and exonuclease activities are not altered (Chaudhuri et al., 2003).

For HCMV, analyses of crystal structures of residues 1-290 of UL44 alone and in complex with a peptide from the extreme C-terminus of UL54 demonstrated that the processivity factor forms a homodimer and adopts a C clamp-shape structure (Appleton et al., 2006; Appleton et al., 2004). UL44 possesses a nuclear localisation signal which allows the protein to be translocated into the nucleus after its dimerization (Alvisi et al., 2011). It has been shown that UL44 homodimer surrounds and binds to DNA through basic side chains of its amino acids and gap loops (Komazin-

Meredith et al., 2008a). The dimerization of UL44 seems important for its processivity function (Loregian et al., 2007). A study showed that a mutant with an impairment of UL44 dimerization exhibits a reduced DNA synthesis which is associated with an altered DNA binding without any effect on its interaction with UL54 (Sinigalia et al., 2008). The authors suggested that UL44 dimerization is important to stabilize the interaction between UL54 catalytic subunit and DNA and that an alteration of this dimerization may block DNA synthesis and HCMV replication. They do not exclude, however, that the dimerization of UL44 could be implicated in the recruitment of other proteins playing a role in viral DNA replication.

6.3. Fidelity and proofreading activity

DNA polymerases have the ability to discriminate between correct and incorrect nucleotides (Patel et al., 1991; Wong et al., 1991). The fidelity of HSV DNA polymerase is lower than those of most DNA polymerases with a rate of incorporation of correct over incorrect nucleotides of 300 (Chaudhuri et al., 2003). During the polymerization process, a nucleotide-binding pocket is formed by the template DNA strand, the 3'-OH end of the primer DNA strand and protein atoms of the DNA polymerase. The base of the incoming nucleotide makes interactions with the base of the last nucleotide incorporated in the primer strand and also forms hydrogen bonds that are complementary to the first unpaired nucleotide on the template DNA strand. The correct nucleotide has a much higher binding affinity for the active site formed by the DNA-polymerase complex, thus enhancing its chance of incorporation into the 3'-OH end of the primer strand. Furthermore, the base of the incoming nucleotide makes closed interactions with the side chains of conserved residues (N815 and Y818) of the fingers domain that participate in the formation of complementary hydrogen bonds and selection of the correct nucleotide (Fig. 4). It is also proposed that the conserved KKRY motif in the palm domain and the side chains of residues Y818, Y884 and D886 could interact with the penultimate base pair in the primer DNA strand (Franklin et al., 2001). These amino acids could sense a mismatched nucleotide in the newly formed DNA duplex because it creates a distortion that leads to an unstable DNA-polymerase complex. The slow extension rate of mismatched primer favors the dissociation of the unstable DNA-polymerase complex and increases its probability to be transferred to the associated 3'-5' exonuclease domain where it can be excised (Chaudhuri et al., 2003; Hwang et al., 1999; Khare and Eckert, 2002; Song et al., 2004).

The 3'-5' exonuclease activity provides a proofreading activity and enhances the fidelity of the polymerase (Friedberg, 2006; Gibbs et al., 1991; Hwang et al., 1999; Song et al., 2004). The fidelity of UL30 DNA polymerase is increased by 39-fold thanks to the editing function of the 3'-

5' exonuclease activity (Song et al., 2004). It has been suggested that the incorporation of a wrong nucleotide can induce a mismatch into the DNA duplex and results in an easier dissociation of the DNA from the enzyme (Zhu et al., 2010). Consequently, the DNA duplex is unwinded and the single-stranded DNA is displaced from the polymerase active site to the 3'-5' nuclease domain where the misincorporated nucleotide is excised. After cleavage, the primer returns to the polymerase catalytic site (Darmawan et al., 2015).

HSV mutants harboring altered residues within conserved Exo I and Exo II motifs could not be isolated (Gibbs et al., 1991; Hall et al., 1995). Mutations (D368A and E370A) localized in the Exo I motif that are involved in the coordination of the metal ions required for catalysis result in no or little exonuclease activity although the polymerase activity is similar or greater than that of wild-type UL30 polymerase (Kuhn and Knopf, 1996; Song et al., 2004). Also, the D368A mutation was lethal for the virus (Hall et al., 1995). It has been shown that Exo II mutants (E460D and G464V) fail to synthesize viral DNA and that these mutations affect both the exonuclease and polymerase activities resulting in a lethal phenotype (Gibbs et al., 1991). Several studies have demonstrated that exonuclease mutants exhibit higher rates of incorporation of mismatched nucleotides. Mutant polymerases with defective exonuclease activity can increase the mutation frequency by up to 3 orders of magnitude (Shin et al., 2001). Laboratory strains containing mutated residues (Y577H and D581A) within the conserved Exo III motif of the exonuclease domain were isolated. These strains were shown to be defective in 3'-5' exonuclease activity (Kuhn and Knopf, 1996) and exhibited extremely high mutation frequencies (Hwang and Hwang, 2003; Hwang et al., 1997). These results suggest that the conserved Exo III motif plays an important role in the intrinsic exonuclease activity and thus in the fidelity of the viral DNA polymerase.

Although many mutations conferring drug resistance are located in the HCMV exonuclease domain, their impact on the fidelity of UL54 DNA polymerase activity has not been thoroughly evaluated so far. Cihlar et al., have shown that the 3'-5' exonuclease activity of a UL54 DNA polymerase harboring mutation K513E was reduced by 98% compared to that of wild-type (Cihlar et al., 1998b). These authors have thus suggested that this HCMV mutant may exhibit an increased mutational frequency.

6.4 RNase activity

The RNase H activity is essential to remove the RNA primers that initiate the synthesis of Okasaki fragments at the replication fork during DNA synthesis (Crute and Lehman, 1989). These authors initially suggested that this activity could be an intrinsic 5'-3' exonuclease function which leads to the degradation of RNA-DNA and DNA-DNA duplexes. However, this activity was

subsequently attributed to the 3'-5' exonuclease domain (Lehman and Boehmer, 1999). Thus, the RNase H activity for herpesvirus DNA polymerases is still not well understood.

7. Antiviral agents and mechanisms of antiviral drug resistance

All antiviral agents currently approved for the treatment of HSV and HCMV infections ultimately target the viral DNA polymerase (Andrei et al., 2009) (Fig. 6). First-line antiviral agents for the treatment of HSV infections include the nucleoside analogues acyclovir (ACV) and penciclovir (PCV) and their respective prodrugs valaciclovir and famciclovir. ACV and PCV are deoxyguanosine analogues that must be phosphorylated by the thymidine kinase (TK) encoded by the HSV *UL23* gene and then by cellular kinases to exert their activity. The triphosphate forms bind to the viral DNA polymerase encoded by the HSV *UL30* gene (Reardon and Spector, 1989). These agents are competitive inhibitors of deoxyguanosine triphosphate (dGTP) for incorporation into the replicating DNA and act as chain terminators. Because of its smaller moiety and the lack of a 3'-OH group, ACV monophosphate interacts more efficiently with the incoming nucleotide which results in the formation of a dead-end complex with UL30 catalytic subunit (Liu et al., 2006; Reardon and Spector, 1989). Furthermore, double-stranded DNA containing ACV at the primer 3'-terminus is a very poor exonuclease substrate due to its different sugar structure that directly interferes with the hydrolysis reaction (Vashishtha and Kuchta, 2016). Ganciclovir (GCV) and its prodrug valganciclovir are first-line antiviral drugs for the prevention and treatment of HCMV diseases. GCV is a deoxyguanosine analogue that requires a first phosphorylation by the protein kinase encoded by the HCMV *UL97* gene and two subsequent phosphorylations by cellular kinases to be active. GCV triphosphate is an inhibitor of the DNA polymerase encoded by the HCMV *UL54* gene and also competes with dGTP for incorporation into replicating DNA where it slows down DNA polymerization and eventually stops chain elongation (Biron et al., 1985).

Second-line antiviral drugs for the treatment of HSV and HCMV infections include cidofovir (CDV) and foscarnet (FOS). CDV is an acyclic deoxycytidine monophosphate which requires only two phosphorylations by cellular enzymes to be converted into its active form. Cidofovir diphosphate stops HCMV DNA synthesis following the addition of two consecutive molecules to elongating DNA (Xiong et al., 1997). FOS is a pyrophosphate analogue which does not require any phosphorylation. FOS directly binds to the pyrophosphate binding site of DNA polymerase and prevents the product release step required for DNA translocation and binding of the next nucleotide which results in cessation of chain elongation (Oberg, 1989). For HSV, it has been proposed that FOS may impair the shift of the DNA duplex from UL30 catalytic subunit by

interacting with the positively-charged side chains of residues R785, R789 and K811 as well as with the two catalytic metal ions (Liu and Homa, 2009).

Long term prophylaxis or treatment with these antiviral agents may result in the emergence of drug-resistant viral isolates. Isolation of drug-resistant HSV from immunocompetent individuals is rare (<1%) but is more common and more likely to be clinically significant in immunocompromised patients (Piret and Boivin, 2011). In this setting, the prevalence of HSV infection with reduced susceptibility to ACV has usually varied from 3% to 10% (Bacon et al., 2003; Christophers et al., 1998; Englund et al., 1990; Nugier et al., 1992; Stranska et al., 2005). In clinical HSV isolates, resistance to ACV is mediated in 90% of the cases by mutations in the UL23 gene encoding the viral TK and, in the remaining cases, by mutations in the UL30 gene encoding the DNA polymerase (Piret and Boivin, 2014). This is explained by the fact that the TK unlike of DNA polymerase is dispensable for viral replication. Mutations conferring resistance to ACV, FOS and/or CDV in HSV clinical isolates have been identified in the conserved regions of the viral DNA polymerase (Fig. 7 and Table 1). Single amino acid substitutions associated with ACV resistance are mostly located in regions II, VI, III and VII of the enzyme; the greatest clusters of mutations being found in regions II and III (Sauerbrei et al., 2011; Schmit and Boivin, 1999). Only a few mutations have been described within the other conserved domains or outside such regions (Schmit and Boivin, 1999). Most FOS-resistant clinical isolates contain single amino acid substitutions in conserved regions II, VI or III and in a non-conserved region (between regions I and VII) of the DNA polymerase (Bestman-Smith and Boivin, 2002; Bestman-Smith and Boivin, 2003; Schmit and Boivin, 1999). Some of these isolates retain susceptibility or, at least, borderline levels of susceptibility to ACV and CDV (Bestman-Smith and Boivin, 2002; Bestman-Smith and Boivin, 2003; Schmit and Boivin, 1999). However, mutations within conserved regions II and VI are frequently associated with resistance to both ACV and FOS. Some mutations such as S724N (region II) and L778M (region VI) in HSV-1 confer cross-resistance to all three antivirals (Bestman-Smith and Boivin, 2003). Genotypic analyses of drug-sensitive isolates reveal a high degree of polymorphism in the UL23 and UL30 genes which may complicate interpretation of genetic analyses (Bohn et al., 2011; Burrel et al., 2010; Frobert et al., 2008; Sauerbrei et al., 2016).

The emergence of drug-resistant HCMV isolates is frequently observed among transplant recipients and much less in HIV-infected patients nowadays. Depending on the transplanted organ and immunosuppression regimen, the incidence of drug resistance among HCMV seropositive donors to seronegative recipients treated for HCMV disease has ranged from 5% to 10% and is up to 30% in lung transplant patients (Hantz et al., 2010; Limaye et al., 2002; Lurain et al., 2002). The vast majority (>90%) of drug-resistant HCMV clinical isolates selected after initial treatment with

GCV contains one or more mutations in the UL97 kinase whereas mutations in the UL54 DNA polymerase are less frequently encountered (Lurain and Chou, 2010). GCV-resistant HCMV clinical isolates with an altered DNA polymerase activity result from numerous mutations widely distributed among the different conserved regions of the enzyme, but mostly occurring between codons 395-545 and 809-987 (Fig. 7 and Table 2) (Lurain and Chou, 2010). DNA polymerase mutations that emerge under GCV therapy can confer cross-resistance to CDV and, less frequently, to FOS. Resistance to both GCV and CDV is associated with mutations located in the exonuclease domains (codons 301, 408-413, 501-545) and in region V (codons 981-987) of the enzyme (Chou et al., 2003; Chou et al., 1997; Chou et al., 2008; Cihlar et al., 1998a; Marfori et al., 2007; Scott et al., 2007; Sullivan et al., 1993). Mutations conferring resistance to FOS are widely dispersed in conserved regions of the UL54 gene. However, clusters of mutations are mainly found in regions II, VI and III and are associated with resistance to FOS alone, to both FOS and GCV and to all three antiviral agents, respectively (Baldanti et al., 1996; Chou et al., 2003; Chou et al., 1997; Chou et al., 2007; Cihlar et al., 1998a; Scott et al., 2007; Weinberg et al., 2003a). Mutations D588N (δ -region C), A834P and G841A (both in region III) as well as the deletion of codons 981-982 (region V) cause cross-resistance to GCV, CDV and FOS (Chou et al., 2000; Sullivan et al., 1993). Finally, the natural polymorphism is more frequent in the UL54 gene than in the UL97 gene and occurs more commonly at non-conserved residues (between codons 614 and 697) (Boutolleau et al., 2011; Chou et al., 1999).

A recent study of Topalis et al. showed that mutations conferring drug resistance in UL30 DNA polymerase are mainly located in the palm (25.0%), fingers (25.0%) and thumb (21.5%) domains whereas a lower proportion of mutations are found in the 3'-5' exonuclease domain (27.3%) (Topalis et al., 2016). In contrast, for UL54 DNA polymerase, drug resistance mutations are mostly detected in the 3'-5' exonuclease domain (60.6%) and to a lower extent in the palm (18.2%), fingers (16.7%) and thumb (4.6%) domains. The different distribution of mutations in DNA polymerase domains may reflect different mechanisms of drug resistance. Mutations conferring resistance to nucleoside analogues located within conserved regions of the polymerase domain might reduce the binding of the inhibitor or the incorporation of the active drug into growing DNA (Huang et al., 1999). It has been suggested that mutations conferring resistance to nucleoside analogues located in the exonuclease domain might enhance the rate of excision of the incorporated drug (Chou et al., 2003). However, a recent study demonstrated that mutant HCMV with reduced exonuclease activity might efficiently synthesize DNA in the absence of drug excision (Chen et al., 2014). It has been proposed that resistance of HSV-1 and HCMV to FOS may result from subtle conformational changes in the DNA polymerase that adopts a more open conformation

to which the drug binds with a lower affinity (Piret et al., 2015; Tchesnokov et al., 2006; Zahn et al., 2011).

By using recombinant viruses, it has been shown that mutations located within conserved regions of UL30 DNA polymerase [i.e., V715M (region II), L778M (region VI) and N961K (region V)] could lead to altered viral replication kinetics (Bestman-Smith and Boivin, 2003) but not mutation D907V located in a non-conserved region (Sergeie and Boivin, 2006). Similarly, UL54 DNA polymerase mutants, such as FOS-resistant strains [i.e., harboring T700A, V715M, E756D/K (all in region II) or T821I mutation (region III)], usually exhibit attenuated or slow growth in cell culture compared to the growth phenotypes of their wild-type counterparts (Baldanti et al., 1996; Chou et al., 2003; Cihlar et al., 1998a; Martin et al., 2010). It is suggested that mutations located in the polymerase domain may affect critical steps of the DNA polymerization process, such as primer-template binding, nucleotide binding, the efficiency of nucleotide incorporation, and/or the processivity of DNA synthesis, leading to altered viral fitness (Deval et al., 2004). Some mutations located in the exonuclease domain of HCMV (i.e., D301N, D413A, K513E and D588N) were also shown to reduce the viral replicative capacity (Chou et al., 2003; Cihlar et al., 1998a; Marfori et al., 2007; Mousavi-Jazi et al., 2001; Springer et al., 2005). Mutations located in the exonuclease domain might affect the fidelity of DNA replication leading to additional mutations that affect viral fitness (Hwang and Hwang, 2003; Hwang et al., 1997).

8. Conclusions and perspectives

The UL30 and UL54 DNA polymerases are key enzymes in the lytic phase of infection by HSV and HCMV. These DNA polymerases are thus attractive targets for the development of potent inhibitors. In fact, limited therapeutic options are currently approved for the prevention or treatment of HSV and HCMV infections and they all ultimately target the viral DNA polymerases. Prolonged therapy with these antivirals may lead to the emergence of drug-resistant isolates that can retain pathogenicity and virulence. Mutations conferring drug resistance have been identified in genes encoding the viral enzymes that phosphorylate drugs and the DNA polymerases itself. There is thus an urgent need to develop novel potent DNA polymerase inhibitors which demonstrate an activity against drug-resistant isolates and an adequate safety profile. In contrast to UL54 DNA polymerase, the UL30 apoenzyme was successfully crystallized and its structure is now considered as the model for herpesvirus DNA polymerases (Liu et al., 2006). A better understanding of the implication of mutations associated with drug resistance on the structure and biochemical activity of herpesvirus DNA polymerases may lead to a more rational structure-based molecular design of novel potent inhibitors (Topalis et al., 2016). Furthermore, a chimeric enzyme was engineered by mutating the

active site of the gp43 DNA polymerase of RB69 bacteriophage to include non-conserved elements from helices N and P of herpesvirus enzymes (Tchesnokov et al., 2009; Zahn et al., 2011). In contrast to the gp43 DNA polymerase which was resistant to FOS, the chimeric enzyme was sensitive to ACV triphosphate as well as FOS. The chimeric enzyme can be easily expressed in *E. coli* and used as a surrogate enzyme for herpesvirus orthologs to develop and evaluate novel potent DNA polymerase inhibitors (Bennett and Gotte, 2013). Finally, inhibitors targeting other enzymes involved in viral replication have been developed such as letermovir which interferes with viral DNA concatemer maturation (Goldner et al., 2011; Lischka et al., 2010). Letermovir is currently under clinical phases of investigation (Chemaly et al., 2014).

Conflict of interest

The authors have declared that no conflict of interest exists.

Acknowledgments

The authors would like to thank Dr Rong Shi from Laval University for the conception of Figures 3 and 4. This study was supported by a grant from the Canadian Institutes of Health Research (MOP-142224 to G.B.). G.B. is the holder of the Canada research chair on emerging viruses and antiviral resistance.

References

- Adams, M.J., Carstens, E.B., 2012. Ratification vote on taxonomic proposals to the International Committee on Taxonomy of Viruses (2012). *Arch Virol* 157, 1411-1422.
- Adelman, K., Salmon, B., Baines, J.D., 2001. Herpes simplex virus DNA packaging sequences adopt novel structures that are specifically recognized by a component of the cleavage and packaging machinery. *Proc Natl Acad Sci U S A* 98, 3086-3091.
- Agut, H., Bonnafous, P., Gautheret-Dejean, A., 2016. Human Herpesviruses 6A, 6B, and 7. *Microbiol Spectr* 4.
- Ahn, J.H., Jang, W.J., Hayward, G.S., 1999. The human cytomegalovirus IE2 and UL112-113 proteins accumulate in viral DNA replication compartments that initiate from the periphery of promyelocytic leukemia protein-associated nuclear bodies (PODs or ND10). *J Virol* 73, 10458-10471.
- Alvisi, G., Marin, O., Pari, G., Mancini, M., Avanzi, S., Loregian, A., Jans, D.A., Ripalti, A., 2011. Multiple phosphorylation sites at the C-terminus regulate nuclear import of HCMV DNA polymerase processivity factor ppUL44. *Virology* 417, 259-267.
- Anders, D.G., Kacica, M.A., Pari, G., Punturieri, S.M., 1992. Boundaries and structure of human cytomegalovirus oriLyt, a complex origin for lytic-phase DNA replication. *J Virol* 66, 3373-3384.
- Andouard, D., Mazon, M.C., Ligat, G., Couvreur, A., Pouteil-Noble, C., Cahen, R., Yasdanpanah, Y., Deering, M., Viget, N., Alain, S., Hantz, S., 2016. Contrasting effect of new HCMV pUL54 mutations on antiviral drug susceptibility: Benefits and limits of 3D analysis. *Antiviral Res* 129, 115-119.
- Andrei, G., De Clercq, E., Snoeck, R., 2009. Viral DNA polymerase inhibitors. In: Raney, D.K., Gotte, M., Cameron, E.C. (Eds.), *Viral genome replication*. Springer US, Boston, pp. 481-526.
- Appleton, B.A., Brooks, J., Loregian, A., Filman, D.J., Coen, D.M., Hogle, J.M., 2006. Crystal structure of the cytomegalovirus DNA polymerase subunit UL44 in complex with the C terminus from the catalytic subunit. Differences in structure and function relative to unliganded UL44. *J Biol Chem* 281, 5224-5232.
- Appleton, B.A., Loregian, A., Filman, D.J., Coen, D.M., Hogle, J.M., 2004. The cytomegalovirus DNA polymerase subunit UL44 forms a C clamp-shaped dimer. *Mol Cell* 15, 233-244.
- Bacon, T.H., Levin, M.J., Leary, J.J., Sarisky, R.T., Sutton, D., 2003. Herpes simplex virus resistance to acyclovir and penciclovir after two decades of antiviral therapy. *Clin Microbiol Rev* 16, 114-128.
- Baldanti, F., Underwood, M.R., Stanat, S.C., Biron, K.K., Chou, S., Sarasini, A., Silini, E., 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, 1390-1395.
- Batterson, W., Roizman, B., 1983. Characterization of the herpes simplex virion-associated factor responsible for the induction of alpha genes. *J Virol* 46, 371-377.
- Beard, P.M., Taus, N.S., 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, 4785-4791.
- Beck, T.W., Millette, R.L., 1982. Regulation of herpes simplex virus gene transcription in vitro. *J Cell Biochem* 19, 333-347.
- Becker, Y., Dym, H., Sarov, I., 1968. Herpes simplex virus DNA. *Virology* 36, 184-192.

Bego, M.G., Keyes, L.R., Maciejewski, J., St Jeor, S.C., 2011. Human cytomegalovirus latency-associated protein LUNA is expressed during HCMV infections in vivo. *Arch Virol* 156, 1847-1851.

Bennett, N., Gotte, M., 2013. Utility of the bacteriophage RB69 polymerase gp43 as a surrogate enzyme for herpesvirus orthologs. *Viruses* 5, 54-86.

Bernad, A., Blanco, L., Lazaro, J.M., Martin, G., Salas, M., 1989. A conserved 3'----5' exonuclease active site in prokaryotic and eukaryotic DNA polymerases. *Cell* 59, 219-228.

Bestman-Smith, J., Boivin, G., 2002. Herpes simplex virus isolates with reduced adefovir susceptibility selected in vivo by foscarnet therapy. *J Med Virol* 67, 88-91.

Bestman-Smith, J., Boivin, G., 2003. Drug resistance patterns of recombinant herpes simplex virus DNA polymerase mutants generated with a set of overlapping cosmids and plasmids. *J Virol* 77, 7820-7829.

Biron, K.K., Stanat, S.C., Sorrell, J.B., Fyfe, J.A., Keller, P.M., Lambe, C.U., Nelson, D.J., 1985. Metabolic activation of the nucleoside analog 9-[(2-hydroxy-1-(hydroxymethyl)ethoxy)methyl]guanine in human diploid fibroblasts infected with human cytomegalovirus. *Proc Natl Acad Sci U S A* 82, 2473-2477.

Boehmer, P.E., Dodson, M.S., Lehman, I.R., 1993. The herpes simplex virus type-1 origin binding protein. DNA helicase activity. *J Biol Chem* 268, 1220-1225.

Boehmer, P.E., Lehman, I.R., 1997. Herpes simplex virus DNA replication. *Annu Rev Biochem* 66, 347-384.

Boehmer, P.E., Nimonkar, A.V., 2003. Herpes virus replication. *IUBMB Life* 55, 13-22.

Bogner, E., Radsak, K., 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, 2259-2264.

Bohn, K., Zell, R., Schacke, M., Wutzler, P., Sauerbrei, A., 2011. Gene polymorphism of thymidine kinase and DNA polymerase in clinical strains of herpes simplex virus. *Antivir Ther* 16, 989-997.

Borst, E.M., Kleine-Albers, J., Gabaev, I., Babic, M., Wagner, K., Binz, A., Degenhardt, I., Kalesse, M., Jonjic, S., Bauerfeind, R., Messerle, M., 2013. The human cytomegalovirus UL51 protein is essential for viral genome cleavage-packaging and interacts with the terminase subunits pUL56 and pUL89. *J Virol* 87, 1720-1732.

Boutolleau, D., Burrel, S., Agut, H., 2011. Genotypic characterization of human cytomegalovirus UL97 phosphotransferase natural polymorphism in the era of ganciclovir and maribavir. *Antiviral Res* 91, 32-35.

Braithwaite, D.K., Ito, J., 1993. Compilation, alignment, and phylogenetic relationships of DNA polymerases. *Nucleic Acids Res* 21, 787-802.

Brautigam, C.A., Steitz, T.A., 1998. Structural and functional insights provided by crystal structures of DNA polymerases and their substrate complexes. *Curr Opin Struct Biol* 8, 54-63.

Burd, C.G., Dreyfuss, G., 1994. Conserved structures and diversity of functions of RNA-binding proteins. *Science* 265, 615-621.

Burkham, J., Coen, D.M., Hwang, C.B., Weller, S.K., 2001. Interactions of herpes simplex virus type 1 with ND10 and recruitment of PML to replication compartments. *J Virol* 75, 2353-2367.

Burrel, S., Deback, C., Agut, H., Boutolleau, D., 2010. Genotypic characterization of UL23 thymidine kinase and UL30 DNA polymerase of clinical isolates of herpes simplex virus: natural polymorphism and mutations associated with resistance to antivirals. *Antimicrob Agents Chemother* 54, 4833-4842.

Campbell, M.E., Palfreyman, J.W., Preston, C.M., 1984. Identification of herpes simplex virus DNA sequences which encode a trans-acting polypeptide responsible for stimulation of immediate early transcription. *J Mol Biol* 180, 1-19.

Carrington-Lawrence, S.D., Weller, S.K., 2003. Recruitment of polymerase to herpes simplex virus type 1 replication foci in cells expressing mutant primase (UL52) proteins. *J Virol* 77, 4237-4247.

Castro, C., Smidansky, E., Maksimchuk, K.R., Arnold, J.J., Korneeva, V.S., Gotte, M., Konigsberg, W., Cameron, C.E., 2007. Two proton transfers in the transition state for nucleotidyl transfer catalyzed by RNA- and DNA-dependent RNA and DNA polymerases. *Proc Natl Acad Sci U S A* 104, 4267-4272.

Cavanaugh, N.A., Kuchta, R.D., 2009. Initiation of new DNA strands by the herpes simplex virus-1 primase-helicase complex and either herpes DNA polymerase or human DNA polymerase alpha. *J Biol Chem* 284, 1523-1532.

Chaudhuri, M., Song, L., Parris, D.S., 2003. The herpes simplex virus type 1 DNA polymerase processivity factor increases fidelity without altering pre-steady-state rate constants for polymerization or excision. *J Biol Chem* 278, 8996-9004.

Chemaly, R.F., Ullmann, A.J., Stoelben, S., Richard, M.P., Bornhauser, M., Groth, C., Einsele, H., Silverman, M., Mullane, K.M., Brown, J., Nowak, H., Kolling, K., Stobernack, H.P., Lischka, P., Zimmermann, H., Rubsamen-Schaeff, H., Champlin, R.E., Ehninger, G., Team, A.I.C.S., 2014. Letermovir for cytomegalovirus prophylaxis in hematopoietic-cell transplantation. *N Engl J Med* 370, 1781-1789.

Chen, H., Beardsley, G.P., Coen, D.M., 2014. Mechanism of ganciclovir-induced chain termination revealed by resistant viral polymerase mutants with reduced exonuclease activity. *Proc Natl Acad Sci U S A* 111, 17462-17467.

Chen, Y., Carrington-Lawrence, S.D., Bai, P., Weller, S.K., 2005. Mutations in the putative zinc-binding motif of UL52 demonstrate a complex interdependence between the UL5 and UL52 subunits of the human herpes simplex virus type 1 helicase/primase complex. *J Virol* 79, 9088-9096.

Chibo, D., Druce, J., Sasadeusz, J., Birch, C., 2004. Molecular analysis of clinical isolates of acyclovir resistant herpes simplex virus. *Antiviral Res* 61, 83-91.

Chou, J., Roizman, B., 1989. Characterization of DNA sequence-common and sequence-specific proteins binding to cis-acting sites for cleavage of the terminal a sequence of the herpes simplex virus 1 genome. *J Virol* 63, 1059-1068.

Chou, S., 2011. Phenotypic diversity of cytomegalovirus DNA polymerase gene variants observed after antiviral therapy. *J Clin Virol* 50, 287-291.

Chou, S., Boivin, G., Ives, J., Elston, R., 2013. Phenotypic evaluation of previously uncharacterized cytomegalovirus DNA polymerase sequence variants detected in a valganciclovir treatment trial. *J Infect Dis*.

Chou, S., Ercolani, R.J., Sahoo, M.K., Lefterova, M.I., Strasfeld, L.M., Pinsky, B.A., 2014. Improved detection of emerging drug-resistant mutant cytomegalovirus subpopulations by deep sequencing. *Antimicrob Agents Chemother* 58, 4697-4702.

Chou, S., Lurain, N.S., Thompson, K.D., Miner, R.C., Drew, W.L., 2003. Viral DNA polymerase mutations associated with drug resistance in human cytomegalovirus. *J Infect Dis* 188, 32-39.

Chou, S., Lurain, N.S., Weinberg, A., Cai, G.Y., Sharma, P.L., 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, 1500-1502.

Chou, S., Marousek, G., Guentzel, S., Follansbee, S.E., Poscher, M.E., Lalezari, J.P., Miner, R.C., Drew, W.L., 1997. Evolution of mutations conferring multidrug resistance during prophylaxis and therapy for cytomegalovirus disease. *J Infect Dis* 176, 786-789.

Chou, S., Marousek, G., Li, S., Weinberg, A., 2008. Contrasting drug resistance phenotypes resulting from cytomegalovirus DNA polymerase mutations at the same exonuclease locus. *J Clin Virol* 43, 107-109.

Chou, S., Marousek, G., Parenti, D.M., Gordon, S.M., LaVoy, A.G., Ross, J.G., Miner, R.C., Drew, W.L., 1998. Mutation in region III of the DNA polymerase gene conferring foscarnet resistance in cytomegalovirus isolates from 3 subjects receiving prolonged antiviral therapy. *J Infect Dis* 178, 526-530.

Chou, S., Marousek, G.I., Van Wechel, L.C., Li, S., Weinberg, A., 2007. Growth and drug resistance phenotypes resulting from cytomegalovirus DNA polymerase region III mutations observed in clinical specimens. *Antimicrob Agents Chemother* 51, 4160-4162.

Chou, S., Miner, R.C., Drew, W.L., 2000. A deletion mutation in region V of the cytomegalovirus DNA polymerase sequence confers multidrug resistance. *J Infect Dis* 182, 1765-1768.

Chow, C.S., Coen, D.M., 1995. Mutations that specifically impair the DNA binding activity of the herpes simplex virus protein UL42. *J Virol* 69, 6965-6971.

Christophers, J., Clayton, J., Craske, J., Ward, R., Collins, P., Trowbridge, M., Darby, G., 1998. Survey of resistance of herpes simplex virus to acyclovir in northwest England. *Antimicrob Agents Chemother* 42, 868-872.

Cihlar, T., Fuller, M.D., Cherrington, J.M., 1998a. Characterization of drug resistance-associated mutations in the human cytomegalovirus DNA polymerase gene by using recombinant mutant viruses generated from overlapping DNA fragments. *J Virol* 72, 5927-5936.

Cihlar, T., Fuller, M.D., Mulato, A.S., Cherrington, J.M., 1998b. 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, 382-393.

Croen, K.D., Ostrove, J.M., Dragovic, L.J., Smialek, J.E., Straus, S.E., 1987. Latent herpes simplex virus in human trigeminal ganglia. Detection of an immediate early gene "anti-sense" transcript by in situ hybridization. *N Engl J Med* 317, 1427-1432.

Crute, J.J., Lehman, I.R., 1989. Herpes simplex-1 DNA polymerase. Identification of an intrinsic 5'-3' exonuclease with ribonuclease H activity. *J Biol Chem* 264, 19266-19270.

Darmawan, H., Harrison, M., Reha-Krantz, L.J., 2015. DNA polymerase 3'-->5' exonuclease activity: Different roles of the beta hairpin structure in family-B DNA polymerases. *DNA Repair (Amst)* 29, 36-46.

Davison, A.J., 2007. Comparative analysis of the genomes. In: Arvin, A., Campadelli-Fiume, G., Mocarski, E., Moore, P.S., Roizman, B., Whitley, R., Yamanishi, K. (Eds.), *Human Herpesviruses: Biology, therapy, and immunoprophylaxis*. Cambridge Press, Cambridge, pp. 10-26.

de Bruyn, A., Knipe, D.M., 1988. Formation of DNA replication structures in herpes virus-infected cells requires a viral DNA binding protein. *Cell* 55, 857-868.

Deiss, L.P., Frenkel, N., 1986. Herpes simplex virus amplicon: cleavage of concatemeric DNA is linked to packaging and involves amplification of the terminally reiterated a sequence. *J Virol* 57, 933-941.

Demarchi, J.M., 1981. Human cytomegalovirus DNA: restriction enzyme cleavage maps and map locations for immediate-early, early, and late RNAs. *Virology* 114, 23-38.

Derbyshire, V., Freemont, P.S., Sanderson, M.R., Beese, L., Friedman, J.M., Joyce, C.M., Steitz, T.A., 1988. Genetic and crystallographic studies of the 3',5'-exonucleolytic site of DNA polymerase I. *Science* 240, 199-201.

Deval, J., Navarro, J.M., Selmi, B., Courcambeck, J., Boretto, J., Halfon, P., Garrido-Urbani, S., Sire, J., Canard, B., 2004. A loss of viral replicative capacity correlates with altered DNA polymerization kinetics by the human immunodeficiency virus reverse transcriptase bearing the K65R and L74V dideoxynucleoside resistance substitutions. *J Biol Chem* 279, 25489-25496.

Digard, P., Bebrin, W.R., Weisshart, K., Coen, D.M., 1993. The extreme C terminus of herpes simplex virus DNA polymerase is crucial for functional interaction with processivity factor UL42 and for viral replication. *J Virol* 67, 398-406.

- Dittmer, D.P., Damania, B., 2016. Kaposi sarcoma-associated herpesvirus: immunobiology, oncogenesis, and therapy. *J Clin Invest* 126, 3165-3175.
- Drouot, E., Piret, J., Lebel, M.H., Boivin, G., 2014. Characterization of Multiple Cytomegalovirus Drug Resistance Mutations Detected in a Haematopoietic Stem Cell Transplant Recipient by Recombinant Phenotyping. *J Clin Microbiol*.
- Ducancelle, A., Champier, G., Alain, S., Petit, F., Le Pors, M.J., Mazon, M.C., 2006. A novel mutation in the UL54 gene of human cytomegalovirus isolates that confers resistance to foscarnet. *Antivir Ther* 11, 537-540.
- Englund, J.A., Zimmerman, M.E., Swierkosz, E.M., Goodman, J.L., Scholl, D.R., Balfour, H.H., Jr., 1990. Herpes simplex virus resistant to acyclovir. A study in a tertiary care center. *Ann Intern Med* 112, 416-422.
- Everett, R.D., 2001. DNA viruses and viral proteins that interact with PML nuclear bodies. *Oncogene* 20, 7266-7273.
- Falkenberg, M., Lehman, I.R., Elias, P., 2000. Leading and lagging strand DNA synthesis in vitro by a reconstituted herpes simplex virus type 1 replisome. *Proc Natl Acad Sci U S A* 97, 3896-3900.
- Fatahadeh, M., Schwartz, R.A., 2007. Human herpes simplex virus infections: epidemiology, pathogenesis, symptomatology, diagnosis, and management. *J Am Acad Dermatol* 57, 737-763.
- Fierer, D.S., Challberg, M.D., 1992. Purification and characterization of UL9, the herpes simplex virus type 1 origin-binding protein. *J Virol* 66, 3986-3995.
- Fischer, L., Imrich, E., Sampaio, K.L., Hofmann, J., Jahn, G., Hamprecht, K., Gohring, K., 2016. Identification of resistance-associated HCMV UL97- and UL54-mutations and a UL97-polymorphism with impact on phenotypic drug-resistance. *Antiviral Res* 131, 1-8.
- Fischer, L., Sampaio, K.L., Jahn, G., Hamprecht, K., Gohring, K., 2015. Identification of newly detected, drug-related HCMV UL97- and UL54-mutations using a modified plaque reduction assay. *J Clin Virol* 69, 150-155.
- Fothergill, M., Goodman, M.F., Petruska, J., Warshel, A., 1995. Structure-energy analysis of the role of metal ions in phosphodiester bond hydrolysis by DNA polymerase I. *J Am Chem Soc* 117, 11619-11627.
- Franklin, M.C., Wang, J., Steitz, T.A., 2001. Structure of the replicating complex of a pol alpha family DNA polymerase. *Cell* 105, 657-667.
- Friedberg, E.C., 2006. The eureka enzyme: the discovery of DNA polymerase. *Nat Rev Mol Cell Biol* 7, 143-147.
- Frobert, E., Cortay, J.C., Ooka, T., Najioullah, F., Thouvenot, D., Lina, B., Morfin, F., 2008. Genotypic detection of acyclovir-resistant HSV-1: characterization of 67 ACV-sensitive and 14 ACV-resistant viruses. *Antiviral Res* 79, 28-36.
- Garcia-Diaz, M., Bebenek, K., 2007. Multiple functions of DNA polymerases. *CRC Crit Rev Plant Sci* 26, 105-122.
- Gershon, A.A., Gershon, M.D., 2013. Pathogenesis and current approaches to control of varicella-zoster virus infections. *Clin Microbiol Rev* 26, 728-743.
- Gibbs, J.S., Chiou, H.C., Bastow, K.F., Cheng, Y.C., Coen, D.M., 1988. Identification of amino acids in herpes simplex virus DNA polymerase involved in substrate and drug recognition. *Proc Natl Acad Sci USA* 85, 6672-6676.
- Gibbs, J.S., Weisshart, K., Digard, P., deBruynKops, A., Knipe, D.M., Coen, D.M., 1991. Polymerization activity of an alpha-like DNA polymerase requires a conserved 3'-5' exonuclease active site. *Mol Cell Biol* 11, 4786-4795.
- Goldner, T., Hewlett, G., Ettischer, N., Ruebsamen-Schaeff, H., Zimmermann, H., Lischka, P., 2011. The novel anticytomegalovirus compound AIC246 (Letermovir) inhibits human cytomegalovirus replication through a specific antiviral mechanism that involves the viral terminase. *J Virol* 85, 10884-10893.

Goodrum, F., Reeves, M., Sinclair, J., High, K., Shenk, T., 2007. Human cytomegalovirus sequences expressed in latently infected individuals promote a latent infection in vitro. *Blood* 110, 937-945.

Gottlieb, J., Marcy, A.I., Coen, D.M., Challberg, M.D., 1990. The herpes simplex virus type 1 UL42 gene product: a subunit of DNA polymerase that functions to increase processivity. *J Virol* 64, 5976-5987.

Hall, J.D., Orth, K.L., Sander, K.L., Swihart, B.M., 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.

Hantz, S., Cotin, S., Borst, E., Couvreur, A., Salmier, A., Garrigue, I., Merville, P., Mengelle, C., Attal, M., Messerle, M., Alain, S., 2013. Novel DNA polymerase mutations conferring cytomegalovirus resistance: input of BAC-recombinant phenotyping and 3D model. *Antiviral Res* 98, 130-134.

Hantz, S., Garnier-Geoffroy, F., Mazon, M.C., Garrigue, I., Merville, P., Mengelle, C., Rostaing, L., Saint Marcoux, F., Essig, M., Rerolle, J.P., Cotin, S., Germi, R., Pillet, S., Lebranchu, Y., Turlure, P., Alain, S., French, C.M.V.R.S.S.G., 2010. Drug-resistant cytomegalovirus in transplant recipients: a French cohort study. *J Antimicrob Chemother* 65, 2628-2640.

Hayward, G.S., Jacob, R.J., Wadsworth, S.C., Roizman, B., 1975. Anatomy of herpes simplex virus DNA: evidence for four populations of molecules that differ in the relative orientations of their long and short components. *Proc Natl Acad Sci U S A* 72, 4243-4247.

Heilbronn, R., Jahn, G., Burkle, A., Freese, U.K., Fleckenstein, B., zur Hausen, H., 1987. Genomic localization, sequence analysis, and transcription of the putative human cytomegalovirus DNA polymerase gene. *J Virol* 61, 119-124.

Heming, J.D., Huffman, J.B., Jones, L.M., Homa, F.L., 2014. Isolation and characterization of the herpes simplex virus 1 terminase complex. *J Virol* 88, 225-236.

Hofmann, H., Sindre, H., Stamminger, T., 2002. Functional interaction between the pp71 protein of human cytomegalovirus and the PML-interacting protein human Daxx. *J Virol* 76, 5769-5783.

Honess, R.W., Roizman, B., 1974. Regulation of herpesvirus macromolecular synthesis. I. Cascade regulation of the synthesis of three groups of viral proteins. *J Virol* 14, 8-19.

Huang, L., Ishii, K.K., Zuccola, H., Gehring, A.M., Hwang, C.B., Hogle, J., Coen, D.M., 1999. The enzymological basis for resistance of herpesvirus DNA polymerase mutants to acyclovir: relationship to the structure of alpha-like DNA polymerases. *Proc Natl Acad Sci U S A* 96, 447-452.

Huang, M.M., Kew, V.G., Justice, K., Wills, M.R., Reeves, M.B., 2012. Efficient human cytomegalovirus reactivation is maturation dependent in the Langerhans dendritic cell lineage and can be studied using a CD14+ experimental latency model. *J Virol* 86, 8507-8515.

Hwang, Y.T., Hwang, C.B., 2003. Exonuclease-deficient polymerase mutant of herpes simplex virus type 1 induces altered spectra of mutations. *J Virol* 77, 2946-2955.

Hwang, Y.T., Liu, B.Y., Coen, D.M., Hwang, C.B., 1997. Effects of mutations in the Exo III motif of the herpes simplex virus DNA polymerase gene on enzyme activities, viral replication, and replication fidelity. *J Virol* 71, 7791-7798.

Hwang, Y.T., Liu, B.Y., Hong, C.Y., Shillito, E.J., Hwang, C.B., 1999. Effects of exonuclease activity and nucleotide selectivity of the herpes simplex virus DNA polymerase on the fidelity of DNA replication in vivo. *J Virol* 73, 5326-5332.

Jenkins, C., Garcia, W., Godwin, M.J., Spencer, J.V., Stern, J.L., Abendroth, A., Slobedman, B., 2008. Immunomodulatory properties of a viral homolog of human interleukin-10 expressed by human cytomegalovirus during the latent phase of infection. *J Virol* 82, 3736-3750.

Jha, H.C., Banerjee, S., Robertson, E.S., 2016. The role of Gammaherpesviruses in cancer pathogenesis. *Pathogens* 5.

Jiang, C., Hwang, Y.T., Randell, J.C., Coen, D.M., Hwang, C.B., 2007a. Mutations that decrease DNA binding of the processivity factor of the herpes simplex virus DNA polymerase reduce viral yield, alter the kinetics of viral DNA replication, and decrease the fidelity of DNA replication. *J Virol* 81, 3495-3502.

Jiang, C., Hwang, Y.T., Wang, G., Randell, J.C., Coen, D.M., Hwang, C.B., 2007b. Herpes simplex virus mutants with multiple substitutions affecting DNA binding of UL42 are impaired for viral replication and DNA synthesis. *J Virol* 81, 12077-12079.

Kagele, D., Gao, Y., Smallenburg, K., Pari, G.S., 2009. Interaction of HCMV UL84 with C/EBPalpha transcription factor binding sites within oriLyt is essential for lytic DNA replication. *Virology* 392, 16-23.

Kagele, D., Rossetto, C.C., Tarrant, M.T., Pari, G.S., 2012. Analysis of the interactions of viral and cellular factors with human cytomegalovirus lytic origin of replication, oriLyt. *Virology* 424, 106-114.

Khare, V., Eckert, K.A., 2002. The proofreading 3'-->5' exonuclease activity of DNA polymerases: a kinetic barrier to translesion DNA synthesis. *Mutat Res* 510, 45-54.

Kim, Y.E., Ahn, J.H., 2010. Role of the specific interaction of UL112-113 p84 with UL44 DNA polymerase processivity factor in promoting DNA replication of human cytomegalovirus. *J Virol* 84, 8409-8421.

Knopf, K.W., 1979. Properties of herpes simplex virus DNA polymerase and characterization of its associated exonuclease activity. *Eur J Biochem* 98, 231-244.

Komazin-Meredith, G., Petrella, R.J., Santos, W.L., Filman, D.J., Hogle, J.M., Verdine, G.L., Karplus, M., Coen, D.M., 2008a. The human cytomegalovirus UL44 C clamp wraps around DNA. *Structure* 16, 1214-1225.

Komazin-Meredith, G., Santos, W.L., Filman, D.J., Hogle, J.M., Verdine, G.L., Coen, D.M., 2008b. The positively charged surface of herpes simplex virus UL42 mediates DNA binding. *J Biol Chem* 283, 6154-6161.

Koonin, E.V., 2006. Temporal order of evolution of DNA replication systems inferred by comparison of cellular and viral DNA polymerases. *Biol Direct* 1, 39.

Kuhn, F.J., Knopf, C.W., 1996. Herpes simplex virus type 1 DNA polymerase. Mutational analysis of the 3'-5'-exonuclease domain. *J Biol Chem* 271, 29245-29254.

Larder, B.A., Kemp, S.D., Darby, G., 1987. Related functional domains in virus DNA polymerases. *EMBO J* 6, 169-175.

Lehman, I.R., Boehmer, P.E., 1999. Replication of herpes simplex virus DNA. *J Biol Chem* 274, 28059-28062.

Limaye, A.P., Raghu, G., Koelle, D.M., Ferrenberg, J., Huang, M.L., Boeckh, M., 2002. High incidence of ganciclovir-resistant cytomegalovirus infection among lung transplant recipients receiving preemptive therapy. *J Infect Dis* 185, 20-27.

Lischka, P., Hewlett, G., Wunberg, T., Baumeister, J., Paulsen, D., Goldner, T., Ruebsamen-Schaeff, H., Zimmermann, H., 2010. In vitro and in vivo activities of the novel anticytomegalovirus compound AIC246. *Antimicrob Agents Chemother* 54, 1290-1297.

Liu, S., Homa, F.L., 2009. Atomic structure of the herpes simplex virus 1 DNA polymerase. In: Raney, D.K., Gotte, M., Cameron, E.C. (Eds.), *Viral genome replication*. Springer US, Boston, pp. 365-381.

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., Seddon, A.P., 2006. Crystal structure of the herpes simplex virus 1 DNA polymerase. *J Biol Chem* 281, 18193-18200.

Loregian, A., Appleton, B.A., Hogle, J.M., Coen, D.M., 2004. Residues of human cytomegalovirus DNA polymerase catalytic subunit UL54 that are necessary and sufficient for interaction with the accessory protein UL44. *J Virol* 78, 158-167.

Loregian, A., Sinigalia, E., Mercorelli, B., Palu, G., Coen, D.M., 2007. Binding parameters and thermodynamics of the interaction of the human cytomegalovirus DNA polymerase accessory protein, UL44, with DNA: implications for the processivity mechanism. *Nucleic Acids Res* 35, 4779-4791.

Lukashchuk, V., McFarlane, S., Everett, R.D., Preston, C.M., 2008. Human cytomegalovirus protein pp71 displaces the chromatin-associated factor ATRX from nuclear domain 10 at early stages of infection. *J Virol* 82, 12543-12554.

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., Yen-Lieberman, B., 2002. Analysis and characterization of antiviral drug-resistant cytomegalovirus isolates from solid organ transplant recipients. *J Infect Dis* 186, 760-768.

Lurain, N.S., Chou, S., 2010. Antiviral drug resistance of human cytomegalovirus. *Clin Microbiol Rev* 23, 689-712.

Marfori, J.E., Exner, M.M., Marousek, G.I., Chou, S., 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, 120-125.

Marsden, H.S., McLean, G.W., Barnard, E.C., Francis, G.J., MacEachran, K., Murphy, M., McVey, G., Cross, A., Abbotts, A.P., Stow, N.D., 1997. The catalytic subunit of the DNA polymerase of herpes simplex virus type 1 interacts specifically with the C terminus of the UL8 component of the viral helicase-primase complex. *J Virol* 71, 6390-6397.

Martin, M., Azzi, A., Lin, S.X., Boivin, G., 2010. Opposite effect of two cytomegalovirus DNA polymerase mutations on replicative capacity and polymerase activity. *Antivir Ther* 15, 579-586.

Masse, M.J., Karlin, S., Schachtel, G.A., Mocarski, E.S., 1992. Human cytomegalovirus origin of DNA replication (oriLyt) resides within a highly complex repetitive region. *Proc Natl Acad Sci U S A* 89, 5246-5250.

Mellerick, D.M., Fraser, N.W., 1987. Physical state of the latent herpes simplex virus genome in a mouse model system: evidence suggesting an episomal state. *Virology* 158, 265-275.

Mocarski, E.S., Senk, T., Griffiths, P.D., Pass, R.F., 2013. Cytomegalovirus. In: Knipe, D.M., Howley, P.M. (Eds.), *Fields Virology*. Vol. II. Lippincott Williams & Wilkins, Philadelphia, pp. 1960-2014.

Mocarsky, E.S., 2007. Betaherpesvirus genes and their functions. In: Arvin, A.M., Campadelli-Fiume, G., Mocarsky, E.S. (Eds.), *Human Herpesviruses: Biology, therapy and immunoprophylaxis*. Cambridge Press, Cambridge, pp. 204-230.

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

Nadal, M., Mas, P.J., Blanco, A.G., Arnan, C., Sola, M., Hart, D.J., Coll, M., 2010. Structure and inhibition of herpesvirus DNA packaging terminase nuclease domain. *Proc Natl Acad Sci U S A* 107, 16078-16083.

Nasseri, M., Mocarski, E.S., 1988. The cleavage recognition signal is contained within sequences surrounding an a-a junction in herpes simplex virus DNA. *Virology* 167, 25-30.

Nishiyama, Y., Maeno, K., Yoshida, S., 1983. Characterization of human cytomegalovirus-induced DNA polymerase and the associated 3'-to-5', exonuclease. *Virology* 124, 221-231.

Nugier, F., Colin, J.N., Aymard, M., Langlois, M., 1992. Occurrence and characterization of acyclovir-resistant herpes simplex virus isolates: report on a two-year sensitivity screening survey. *J Med Virol* 36, 1-12.

O'Connor, C.M., Vanicek, J., Murphy, E.A., 2014. Host microRNA regulation of human cytomegalovirus immediate early protein translation promotes viral latency. *J Virol* 88, 5524-5532.

Oberg, B., 1989. Antiviral effects of phosphonoformate (PFA, foscarnet sodium). *Pharmacol Ther* 40, 213-285.

- Ollis, D.L., Brick, P., Hamlin, R., Xuong, N.G., Steitz, T.A., 1985. Structure of large fragment of *Escherichia coli* DNA polymerase I complexed with dTMP. *Nature* 313, 762-766.
- Pari, G.S., 2008. Nuts and bolts of human cytomegalovirus lytic DNA replication. *Curr Top Microbiol Immunol* 325, 153-166.
- Park, M.Y., Kim, Y.E., Seo, M.R., Lee, J.R., Lee, C.H., Ahn, J.H., 2006. Interactions among four proteins encoded by the human cytomegalovirus UL112-113 region regulate their intranuclear targeting and the recruitment of UL44 to prereplication foci. *J Virol* 80, 2718-2727.
- Parris, D.S., Cross, A., Haarr, L., Orr, A., Frame, M.C., Murphy, M., McGeoch, D.J., Marsden, H.S., 1988. Identification of the gene encoding the 65-kilodalton DNA-binding protein of herpes simplex virus type 1. *J Virol* 62, 818-825.
- Patel, S.S., Wong, I., Johnson, K.A., 1991. Pre-steady-state kinetic analysis of processive DNA replication including complete characterization of an exonuclease-deficient mutant. *Biochemistry* 30, 511-525.
- Pellet, P.E., Roizman, B., 2013. Herpesviridae. In: Knipe, D.M., Howley, P.M. (Eds.), *Fields Virology*, Sixth ed. Vol. II. Lippincott Williams, Philadelphia, pp. 1802-1822.
- Penfold, M.E., Mocarski, E.S., 1997. Formation of cytomegalovirus DNA replication compartments defined by localization of viral proteins and DNA synthesis. *Virology* 239, 46-61.
- Peng, G.C., Jones, C., 2010. Towards an understanding of the herpes simplex virus type 1 latency-reactivation cycle. *Interdiscip Perspect Infect Dis* 2010, 262415.
- Piret, J., Boivin, G., 2011. Resistance of herpes simplex viruses to nucleoside analogues: mechanisms, prevalence, and management. *Antimicrob Agents Chemother* 55, 459-472.
- Piret, J., Boivin, G., 2014. Antiviral drug resistance in herpesviruses other than cytomegalovirus. *Rev Med Virol* 24, 186-218.
- Piret, J., Goyette, N., Eckenroth, B.E., Drouot, E., Gotte, M., Boivin, G., 2015. Contrasting effects of W781V and W780V mutations in helix N of herpes simplex virus 1 and human cytomegalovirus DNA polymerases on antiviral drug susceptibility. *J Virol* 89, 4636-4644.
- Poole, E., Sinclair, J., 2015. Sleepless latency of human cytomegalovirus. *Med Microbiol Immunol* 204, 421-429.
- Quinlan, M.P., Chen, L.B., Knipe, D.M., 1984. The intranuclear location of a herpes simplex virus DNA-binding protein is determined by the status of viral DNA replication. *Cell* 36, 857-868.
- Randell, J.C., Coen, D.M., 2004. The herpes simplex virus processivity factor, UL42, binds DNA as a monomer. *J Mol Biol* 335, 409-413.
- Randell, J.C., Komazin, G., Jiang, C., Hwang, C.B., Coen, D.M., 2005. Effects of substitutions of arginine residues on the basic surface of herpes simplex virus UL42 support a role for DNA binding in processive DNA synthesis. *J Virol* 79, 12025-12034.
- Reardon, J.E., Spector, T., 1989. Herpes simplex virus type 1 DNA polymerase. Mechanism of inhibition by acyclovir triphosphate. *J Biol Chem* 264, 7405-7411.
- Rodriguez, A.C., Park, H.W., Mao, C., Beese, L.S., 2000. Crystal structure of a pol alpha family DNA polymerase from the hyperthermophilic archaeon *Thermococcus* sp. 9 degrees N-7. *J Mol Biol* 299, 447-462.
- Roizman, B., 1979. The organization of the herpes simplex virus genomes. *Annu Rev Genet* 13, 25-57.
- Roizman, B., Knipe, D.M., Whitley, R.J., 2013. Herpes Simplex Viruses. In: Knipe, D.M., Howley, P.M. (Eds.), *Fields Virology*, Sixth ed. Vol. II. Lippincott Williams & Wilkins, Philadelphia, pp. 1823-1897.
- Sarisky, R.T., Hayward, G.S., 1996. Evidence that the UL84 gene product of human cytomegalovirus is essential for promoting oriLyt-dependent DNA replication and formation of replication compartments in cotransfection assays. *J Virol* 70, 7398-7413.

Sauer, A., Wang, J.B., Hahn, G., McVoy, M.A., 2010. A human cytomegalovirus deleted of internal repeats replicates with near wild type efficiency but fails to undergo genome isomerization. *Virology* 401, 90-95.

Sauerbrei, A., Bohn-Wippert, K., Kaspar, M., Krumbholz, A., Karrasch, M., Zell, R., 2016. Database on natural polymorphisms and resistance-related non-synonymous mutations in thymidine kinase and DNA polymerase genes of herpes simplex virus types 1 and 2. *J Antimicrob Chemother* 71, 6-16.

Sauerbrei, A., Bohn, K., Heim, A., Hofmann, J., Weissbrich, B., Schnitzler, P., Hoffmann, D., Zell, R., Jahn, G., Wutzler, P., Hamprecht, K., 2011. Novel resistance-associated mutations of thymidine kinase and DNA polymerase genes of herpes simplex virus type 1 and type 2. *Antivir Ther* 16, 1297-1308.

Schmit, I., Boivin, G., 1999. Characterization of the DNA polymerase and thymidine kinase genes of herpes simplex virus isolates from AIDS patients in whom acyclovir and foscarnet therapy sequentially failed. *J Infect Dis* 180, 487-490.

Schrodinger, L.L.C., 2010. The Pymol Molecular Graphics System, version 1.3rl. Schrödinger K. K.

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

Sergerie, Y., Boivin, G., 2006. Thymidine kinase mutations conferring acyclovir resistance in herpes simplex type 1 recombinant viruses. *Antimicrob Agents Chemother* 50, 3889-3892.

Shamoo, Y., Steitz, T.A., 1999. Building a replisome from interacting pieces: sliding clamp complexed to a peptide from DNA polymerase and a polymerase editing complex. *Cell* 99, 155-166.

Shapira, M.Y., Resnick, I.B., Chou, S., Neumann, A.U., Lurain, N.S., Stamminger, T., Caplan, O., Saleh, N., Efferth, T., Marschall, M., 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, 1455-1457.

Sheldrick, P., Berthelot, N., 1975. Inverted repetitions in the chromosome of herpes simplex virus. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol* 39 Pt 2, 667-678.

Shi, R., Azzi, A., Gilbert, C., Boivin, G., Lin, S.X., 2006. Three-dimensional modeling of cytomegalovirus DNA polymerase and preliminary analysis of drug resistance. *Proteins* 64, 301-307.

Shin, Y.K., Cai, G.Y., Weinberg, A., Leary, J.J., Levin, M.J., 2001. Frequency of acyclovir-resistant herpes simplex virus in clinical specimens and laboratory isolates. *J Clin Microbiol* 39, 913-917.

Sinclair, J.H., Reeves, M.B., 2013. Human cytomegalovirus manipulation of latently infected cells. *Viruses* 5, 2803-2824.

Sinigalia, E., Alvisi, G., Mercorelli, B., Coen, D.M., Pari, G.S., Jans, D.A., Ripalti, A., Palu, G., Loregian, A., 2008. Role of homodimerization of human cytomegalovirus DNA polymerase accessory protein UL44 in origin-dependent DNA replication in cells. *J Virol* 82, 12574-12579.

Skaliter, R., Makhov, A.M., Griffith, J.D., Lehman, I.R., 1996. Rolling circle DNA replication by extracts of herpes simplex virus type 1-infected human cells. *J Virol* 70, 1132-1136.

Song, L., Chaudhuri, M., Knopf, C.W., Parris, D.S., 2004. Contribution of the 3'- to 5'-exonuclease activity of herpes simplex virus type 1 DNA polymerase to the fidelity of DNA synthesis. *J Biol Chem* 279, 18535-18543.

Sourvinos, G., Everett, R.D., 2002. Visualization of parental HSV-1 genomes and replication compartments in association with ND10 in live infected cells. *EMBO J* 21, 4989-4997.

- Springer, K.L., Chou, S., Li, S., Giller, R.H., Quinones, R., Shira, J.E., 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, 208-213.
- Steininger, C., 2007. Clinical relevance of cytomegalovirus infection in patients with disorders of the immune system. *Clin Microbiol Infect* 13, 953-963.
- Steitz, T.A., 1998. A mechanism for all polymerases. *Nature* 391, 231-232.
- Steitz, T.A., 1999. DNA polymerases: structural diversity and common mechanisms. *J Biol Chem* 274, 17395-17398.
- Stinski, M.F., Isomura, H., 2008. Role of the cytomegalovirus major immediate early enhancer in acute infection and reactivation from latency. *Med Microbiol Immunol* 197, 223-231.
- Stranska, R., Schuurman, R., Nienhuis, E., Goedegebuure, I.W., Polman, M., Weel, J.F., Wertheim-Van Dillen, P.M., Berkhout, R.J., van Loon, A.M., 2005. Survey of acyclovir-resistant herpes simplex virus in the Netherlands: prevalence and characterization. *J Clin Virol* 32, 7-18.
- Sullivan, V., Biron, K.K., Talarico, C., Stanat, S.C., Davis, M., Pozzi, L.M., 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, 19-25.
- Tan, J.C., Avdic, S., Cao, J.Z., Mocarski, E.S., White, K.L., Abendroth, A., Slobedman, B., 2011. Inhibition of 2',5'-oligoadenylate synthetase expression and function by the human cytomegalovirus ORF94 gene product. *J Virol* 85, 5696-5700.
- Tchesnokov, E.P., Gilbert, C., Boivin, G., Gotte, M., 2006. Role of helix P of the human cytomegalovirus DNA polymerase in resistance and hypersusceptibility to the antiviral drug foscarnet. *J Virol* 80, 1440-1450.
- Tchesnokov, E.P., Obikhod, A., Schinazi, R.F., Gotte, M., 2009. Engineering of a chimeric RB69 DNA polymerase sensitive to drugs targeting the cytomegalovirus enzyme. *J Biol Chem* 284, 26439-26446.
- Terrell, S.L., Coen, D.M., 2012. The pre-NH(2)-terminal domain of the herpes simplex virus 1 DNA polymerase catalytic subunit is required for efficient viral replication. *J Virol* 86, 11057-11065.
- Terrell, S.L., Pesola, J.M., Coen, D.M., 2014. Roles of conserved residues within the pre-NH2-terminal domain of herpes simplex virus 1 DNA polymerase in replication and latency in mice. *J Gen Virol* 95, 940-947.
- Topalis, D., Gillemot, S., Snoeck, R., Andrei, G., 2016. Distribution and effects of amino acid changes in drug-resistant alpha and beta herpesviruses DNA polymerase. *Nucleic Acids Res.*
- Tsurumi, T., Maeno, K., Nishiyama, Y., 1987. Nucleotide sequence of the DNA polymerase gene of herpes simplex virus type 2 and comparison with the type 1 counterpart. *Gene* 52, 129-137.
- Vashishtha, A.K., Kuchta, R.D., 2016. Effects of Acyclovir, Foscarnet, and Ribonucleotides on Herpes Simplex Virus-1 DNA Polymerase: Mechanistic Insights and a Novel Mechanism for Preventing Stable Incorporation of Ribonucleotides into DNA. *Biochemistry* 55, 1168-1177.
- Wang, J., Sattar, A.K., Wang, C.C., Karam, J.D., Konigsberg, W.H., Steitz, T.A., 1997. Crystal structure of a pol alpha family replication DNA polymerase from bacteriophage RB69. *Cell* 89, 1087-1099.
- Wang, J.B., McVoy, M.A., 2011. A 128-base-pair sequence containing the pac1 and a presumed cryptic pac2 sequence includes cis elements sufficient to mediate efficient genome maturation of human cytomegalovirus. *J Virol* 85, 4432-4439.
- Weinberg, A., Jabs, D.A., Chou, S., Martin, B.K., Lurain, N.S., Forman, M.S., Crumpacker, C., 2003a. Mutations conferring foscarnet resistance in a cohort of patients with acquired immunodeficiency syndrome and cytomegalovirus retinitis. *J Infect Dis* 187, 777-784.
- Weinberg, A., Jabs, D.A., Chou, S., Martin, B.K., Lurain, N.S., Forman, M.S., Crumpacker, C., Cytomegalovirus, R., Viral Resistance Study, G., Adult, A.C.T.G.C.L., 2003b.

Mutations conferring foscarnet resistance in a cohort of patients with acquired immunodeficiency syndrome and cytomegalovirus retinitis. *J Infect Dis* 187, 777-784.

Weisshart, K., Chow, C.S., Coen, D.M., 1999. Herpes simplex virus processivity factor UL42 imparts increased DNA-binding specificity to the viral DNA polymerase and decreased dissociation from primer-template without reducing the elongation rate. *J Virol* 73, 55-66.

Weisshart, K., Kuo, A.A., Hwang, C.B., Kumura, K., Coen, D.M., 1994. Structural and functional organization of herpes simplex virus DNA polymerase investigated by limited proteolysis. *J Biol Chem* 269, 22788-22796.

Weller, S.K., Coen, D.M., 2012. Herpes simplex viruses: mechanisms of DNA replication. *Cold Spring Harb Perspect Biol* 4, a013011.

Weller, S.K., Spadaro, A., Schaffer, J.E., Murray, A.W., Maxam, A.M., Schaffer, P.A., 1985. Cloning, sequencing, and functional analysis of oriL, a herpes simplex virus type 1 origin of DNA synthesis. *Mol Cell Biol* 5, 930-942.

Wong, I., Patel, S.S., Johnson, K.A., 1991. An induced-fit kinetic mechanism for DNA replication fidelity: direct measurement by single-turnover kinetics. *Biochemistry* 30, 526-537.

Wong, S.W., Wahl, A.F., Yuan, P.M., Arai, N., Pearson, B.E., Arai, K., Korn, D., Hunkapiller, M.W., Wang, T.S., 1988. Human DNA polymerase alpha gene expression is cell proliferation dependent and its primary structure is similar to both prokaryotic and eukaryotic replicative DNA polymerases. *EMBO J* 7, 37-47.

Woon, H.G., Scott, G.M., Yiu, K.L., Miles, D.H., Rawlinson, W.D., 2008. Identification of putative functional motifs in viral proteins essential for human cytomegalovirus DNA replication. *Virus Genes* 37, 193-202.

Xia, S., Wang, M., Blaha, G., Konigsberg, W.H., Wang, J., 2011. Structural insights into complete metal ion coordination from ternary complexes of B family RB69 DNA polymerase. *Biochemistry* 50, 9114-9124.

Xiong, X., Smith, J.L., Chen, M.S., 1997. Effect of incorporation of cidofovir into DNA by human cytomegalovirus DNA polymerase on DNA elongation. *Antimicrob Agents Chemother* 41, 594-599.

Xu, Y., Cei, S.A., Rodriguez Huete, A., Colletti, K.S., Pari, G.S., 2004. Human cytomegalovirus DNA replication requires transcriptional activation via an IE2- and UL84-responsive bidirectional promoter element within oriLyt. *J Virol* 78, 11664-11677.

Zahn, K.E., Tchesnokov, E.P., Gotte, M., Doublet, S., 2011. Phosphonoformic acid inhibits viral replication by trapping the closed form of the DNA polymerase. *J Biol Chem* 286, 25246-25255.

Zhang, J., Chung, D.W., Tan, C.K., Downey, K.M., Davie, E.W., So, A.G., 1991. Primary structure of the catalytic subunit of calf thymus DNA polymerase delta: sequence similarities with other DNA polymerases. *Biochemistry* 30, 11742-11750.

Zhao, Y., Jeruzalmi, D., Moarefi, I., Leighton, L., Lasken, R., Kuriyan, J., 1999. Crystal structure of an archaeobacterial DNA polymerase. *Structure* 7, 1189-1199.

Zhu, Y., Huang, L., Anders, D.G., 1998. Human cytomegalovirus oriLyt sequence requirements. *J Virol* 72, 4989-4996.

Zhu, Y., Stroud, J., Song, L., Parris, D.S., 2010. Kinetic approaches to understanding the mechanisms of fidelity of the herpes simplex virus type 1 DNA polymerase. *J Nucleic Acids* 2010, 631595.

Zuccola, H.J., Filman, D.J., Coen, D.M., Hogle, J.M., 2000. The crystal structure of an unusual processivity factor, herpes simplex virus UL42, bound to the C terminus of its cognate polymerase. *Mol Cell* 5, 267-278.

Table 1: Amino acid substitutions associated with drug resistance in the DNA polymerase of clinical HSV-1 strains

aa changes	Phenotypic test	Confirmation by	Drug phenotype (fold change)*	References
Region II (aa 694-736)				
R700G	PRA	Recombinant virus	ACV ^R (NA), FOS ^R (NA)	(Gibbs et al., 1988)
A719V	PRA	Recombinant virus	ACV ^R (19.0x), FOS ^R (NA), CDV ^{S/B} (NA)	(Larder et al., 1987)
S724N	PRA	Recombinant virus	ACV ^R (9.9x), FOS ^R (2.7x), CDV ^R (2.1x)	(Bestman-Smith and Boivin, 2002) (Bestman-Smith and Boivin, 2003)
Between regions II and VI				
E771Q	PRA	---	ACV ^R , FOS ^S	(Chibo et al., 2004)
Region III (aa 805-845)				
N815S	PRA	Recombinant virus	ACV ^R (59.0x-233.0x)	(Larder et al., 1987)
G841S	PRA	Recombinant virus	ACV ^R (29.0x)	(Larder et al., 1987)
Region VII (aa 938-946)				
Y941H	PRA	Recombinant virus	ACV ^R (9.4x), FOS ^S (1.4x), CDV ^{HS} (0.4x)	(Bestman-Smith and Boivin, 2003)

ACV, acyclovir; FOS, foscarnet; CDV, cidofovir; PRA, plaque reduction assay; ^B, borderline level of resistance; ^{HS}, hypersusceptible; ^R, resistant; ^S, susceptible; EC₅₀, concentration of antiviral that reduces the number of viral plaques by 50%

*, Fold changes are calculated as the ratio of the EC₅₀ values of mutant recombinant virus to the wild type counterpart

Table 2: Amino acid substitutions associated with drug resistance in the DNA polymerase of clinical HCMV strains

aa changes	Fold changes* in EC ₅₀ values for			References
	GCV	FOS	CDV	
Exo I (aa 295-304)				
D301N	2.6	0.5	3.0	(Chou et al., 2003)
Exo II (aa 379-421)				
N408D	4.9	1.3	5.6	(Cihlar et al., 1998a)
N408K	4.2	0.7	21.0	(Scott et al., 2007)
N408S	3.1	1.0	7.5	(Hantz et al., 2013)
N410K	2.9	0.8	3.0	(Chou et al., 2003)
F412C	4.2	1.2	18.0	(Chou et al., 1997)
F412L	4.6	1.1	9.4	(Chou, 2011)
F412S	5.3	0.8	13.0	(Chou, 2011)
F412V	4.3	1.1	15.5	(Cihlar et al., 1998a)
D413A	6.5	0.8	11.0	(Marfori et al., 2007)
D413E	4.8	0.8	4.3	(Chou et al., 2003)
D413N	3.8	1.0	10.0	(Chou et al., 2014)
Exo III (aa 492-588)				
N495K	1.1	3.4	1.1	(Ducancelle et al., 2006)
L501I	6.0	1.4	9.1	(Cihlar et al., 1998a)
T503I	2.9	0.5	6.1	(Chou et al., 2003)
A505V	1.9	1.0	1.9	(Chou et al., 2013)
K513E	5.0	1.4	9.1	(Cihlar et al., 1998a)
K513N	6.0	1.1	12.5	(Cihlar et al., 1998b)
K513R	3.7	1.1	10.0	(Chou et al., 2014)
D515E	5.0	1.4	9.1	(Fischer et al., 2015)
D515Y	6.2	4.7	0.9	(Andouard et al., 2016)
L516R	2.1	0.8	5.1	(Chou et al., 2003)
L516W	4.2	1.2	8.5	(Fischer et al., 2016)
I521T	2.1-3.1	0.9-1.0	3.9-4.9	(Chou et al., 2008) (Fischer et al., 2015)
P522A	3.0	1.0	4.1	(Chou et al., 2008)
P522S	3.1	1.1	3.6	(Cihlar et al., 1998a)
del524	3.5	1.1	9.7	(Hantz et al., 2013)
V526L	5.5	1.8	2.5	(Drouot et al., 2014)
C539G	3.1	1.0	4.4	(Chou et al., 2014)
L545S	3.5	1.2	9.1	(Cihlar et al., 1998a)

L545W	4.9	1.3	6.3	(Chou, 2011)
Q578H	3.3	4.5	2.3	(Chou, 2011)
Q578L	1.9	3.0	0.8	(Chou et al., 2013)
D588E	1.3	2.3	1.1	(Cihlar et al., 1998a)
D588N	3.8	3.2-9.0	2.7	(Springer et al., 2005) (Mousavi-Jazi et al., 2001)
Region II (aa 696-742)				
T700A	0.9	4.7	1.5	(Baldanti et al., 1996)
V715A	1.8	2.5	0.5	(Fischer et al., 2016)
V715M	1.0-1.3	2.7-5.5	0.6-1.1	(Baldanti et al., 1996) (Fischer et al., 2016)
I726T	2.0	1.1	1.7	(Chou et al., 2013)
I726V	1.9	1.9	1.2	(Chou et al., 2013)
Between regions II and VI				
E756D	1.2	3.4	0.7	(Chou et al., 2003)
E756K	3.5	>8.0	2.2	(Chou et al., 2003)
E756Q	1.7	4.3	1.0	(Weinberg et al., 2003)
Region VI (aa 771-790)				
L773V	3.0	4.4	2.5	(Chou et al., 2014)
L776M	2.5	3.5	1.0	(Shapira et al., 2008)
V781I	1.0-4.0	4.0-5.2	1.2	(Cihlar et al., 1998a) (Mousavi-Jazi et al., 2001)
V787A	4.7	3.2	0.7	(Andouard et al., 2016)
V787L	2.4	4.1	1.0	(Weinberg et al., 2003)
Between regions VI and III				
L802M	1.1-3.5	3.2-10.8	0.9-1.8	(Chou et al., 1997) (Cihlar et al., 1998a)
Region III (aa 805-845)				
K805Q	1.0	0.2	2.2	(Cihlar et al., 1998a)
A809V	2.6	6.3	1.7	(Chou et al., 1998)
V812L	2.5	4.9	2.7	(Cihlar et al., 1998b)
T813S	2.5	4.9	2.7	(Chou et al., 2007)
T821I	4.5	21.0	1.9	(Cihlar et al., 1998a)
A834P	5.4	6.4	3.0	(Scott et al., 2007)
T838A	1.8	2.4	0.8	(Springer et al., 2005)
G841A	3.2	4.3	2.6	(Chou et al., 2007)
G841S	2.2	2.1	1.1	(Chou et al., 2013)

Region V (aa 978-988)

del981-982	8.3	3.6	2.8	(Chou et al., 2000)
A987G	5.3	1.2	11.3	(Sullivan et al., 1993)

GCV, ganciclovir; FOS, foscarnet; CDV, cidofovir. EC₅₀, concentration of antiviral that reduces the number of viral plaques by 50%

*, Fold changes are calculated as the ratio of EC₅₀ values of mutant recombinant virus to the wild-type counterpart. An increase in EC₅₀ value \geq 1.9-fold higher than that of the wild-type strain corresponds to drug resistance (in bold)

Regions indicated in brackets are located between conserved regions

Figures

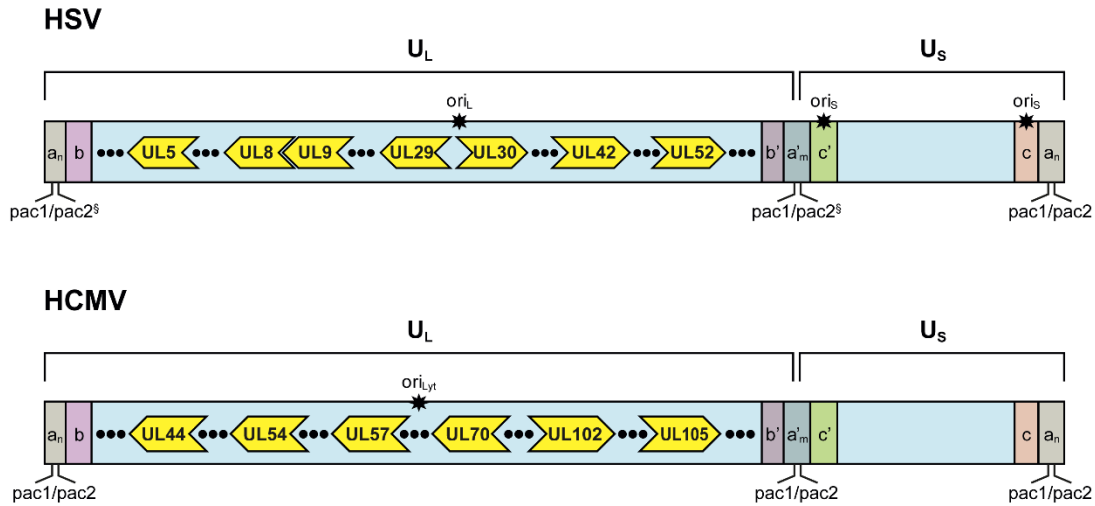


Fig. 1: Organization of HSV and HCMV genomes including genes involved in viral DNA replication. Both HSV and HCMV genomes contain a unique long (U_L) and a unique short (U_S) sequences flanked by inverted repeats. U_L is flanked by «a_nb» and «b'a'm» elements whereas U_S sequence is flanked by «a'mc'» and «ca_n» elements. HSV genome contains one origin of replication, called ori_L, in the U_L sequence and another one, called ori_S, present in two copies in the U_S sequence. Seven viral proteins are implicated in the DNA replication of HSV, namely the UL9 origin binding protein, ICP8 single-stranded DNA-binding protein (encoded by *UL29* gene), UL30 DNA polymerase and its UL42 processivity factor as well as the helicase-primase complex (encoded by *UL5*, *UL8* and *UL52* genes). HCMV genome contains only one origin of replication, called ori_{Lyt}, in the U_L sequence. Six viral proteins are involved in the DNA replication of HCMV, namely the single-stranded DNA-binding protein (encoded by *UL57* gene), UL54 DNA polymerase and its UL44 processivity factor and the helicase-primase complex (encoded by *UL105*, *UL70* and *UL102* genes). §, contains one or reiterated *pac1/pac2* sequences.

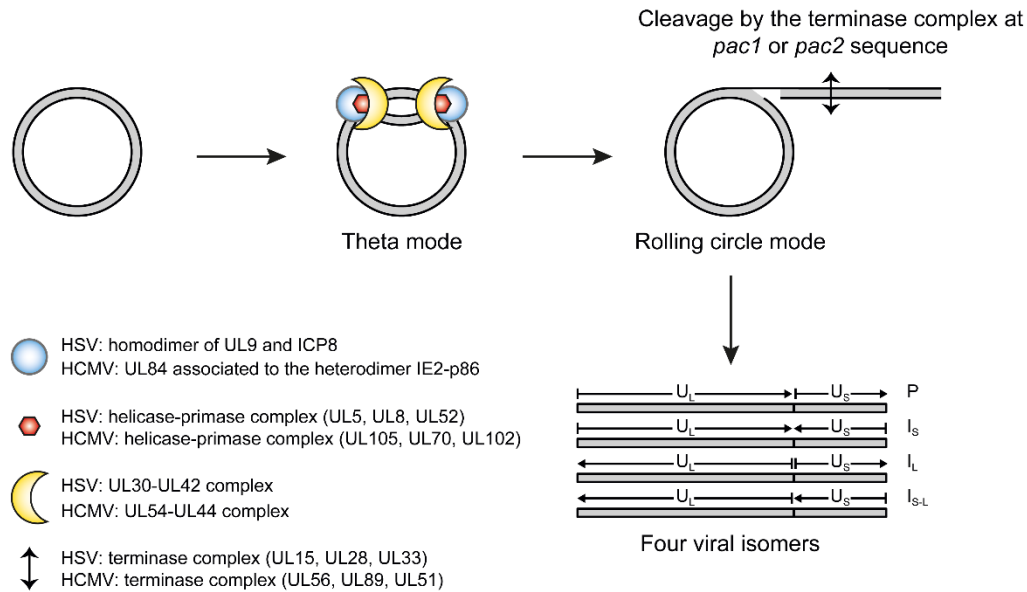


Fig. 2: Schematic representation of the mechanisms of HSV and HCMV genome replication. After entry into cells, the viral DNA circularizes into the nucleus. For HSV, homodimer of UL9 origin binding protein seems to initiate the DNA replication by binding to specific sequences at one of the origins of replication and ICP8 single-stranded protein is recruited to enhance the helicase activity of UL9. For HCMV, the complex formed by homomultimer of UL84 and IE2-p86 heterodimer initiates DNA synthesis at the origin of replication. The helicase-primase complex is then recruited together with the DNA polymerase associated with its processivity factor (UL30-UL42 and UL54-UL44 for HSV and HCMV, respectively). Both complexes assemble at each replication forks. The viral DNA replication proceeds by a theta mode followed by a rolling circle mechanism. The viral DNA synthesis results in concatemeric structures that are cleaved by the terminase complex at two specific cis-acting sequences (*pac1* and *pac2*) localized within «a» repeated sequences and then packaged into pre-formed capsids. Four viral isomers that differed by the orientation of the U_L and U_S sequences are synthesized and designated as prototype (P), inverted U_S (I_S), inverted U_L (I_L) and inverted U_S and U_L (I_{S-L}), respectively. Adapted from (Roizman et al., 2013).

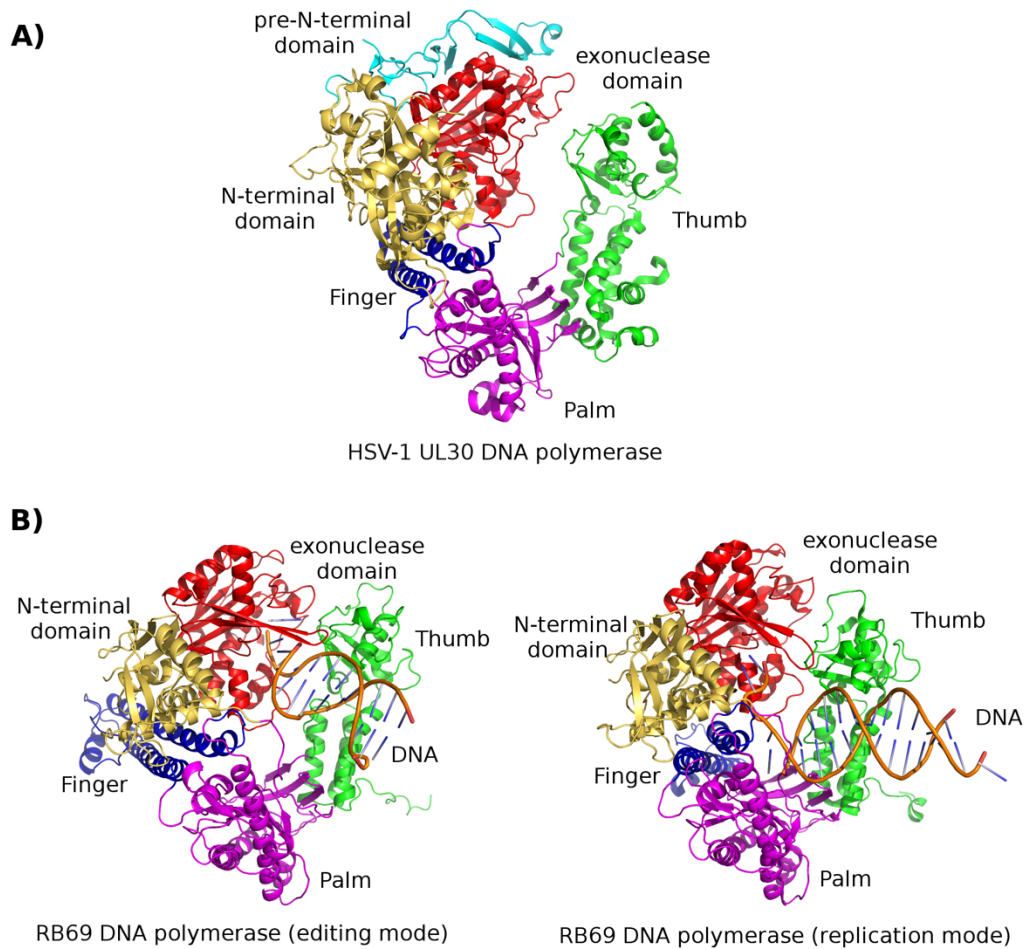


Fig. 3: Cartoon representation of B family DNA polymerases. (A) HSV-1 UL30 DNA polymerase in apo form (PDB 2GV9). Each domain is colored differently with pre-N-terminal domain in cyan, N-terminal domain in light yellow, exonuclease domain in red, palm domain in magenta, fingers domain in blue and thumb domain in green. (B) Both editing (open conformation, PDB 1CLQ, shown in left) and replication (closed conformation, PDB 3LDS, shown in right) modes of RB69 DNA polymerase are displayed. The color schemes are the same as those in (A). The DNA molecules bound to the enzyme are also indicated. This figure was prepared by using PyMol software (Schrodinger, 2010).

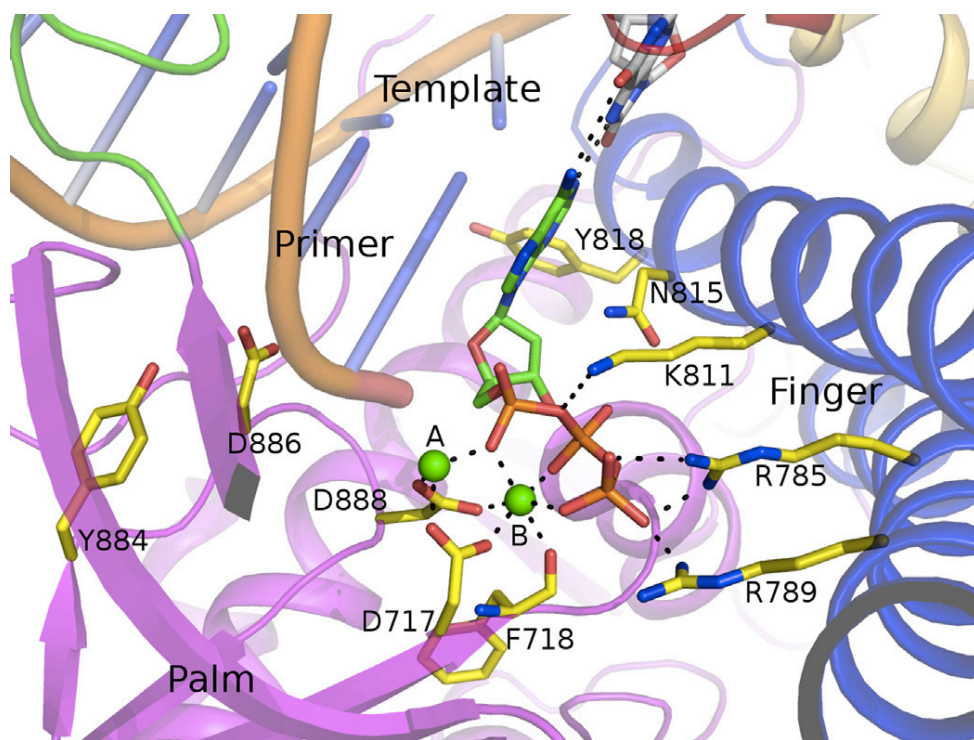


Fig.4: Cartoon representation of critical amino acids involved in DNA polymerisation.

Binding of a primer-template duplex DNA to the apoenzyme
The thumb closed down around the DNA



The fingers domain moves towards
the N-terminal domain
Open conformation



dNTP binding

The fingers domain rotates towards
the polymerase active site (palm domain)
Closed, catalytically-competent conformation



Nucleotidyl transfer onto 3'-OH end of primer strand



Pre-translocated state



Pyrophosphate release

DNA is translocated
Post-translocated state

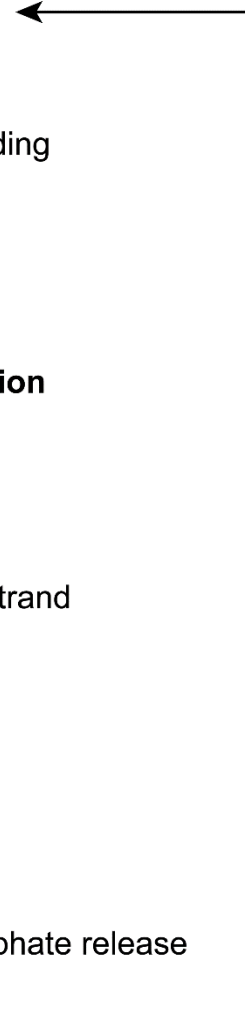


Fig. 5: Diagram illustrating the mechanism of DNA polymerisation by UL30 and UL54 DNA polymerases. Key: dNTP, deoxynucleotide triphosphate.

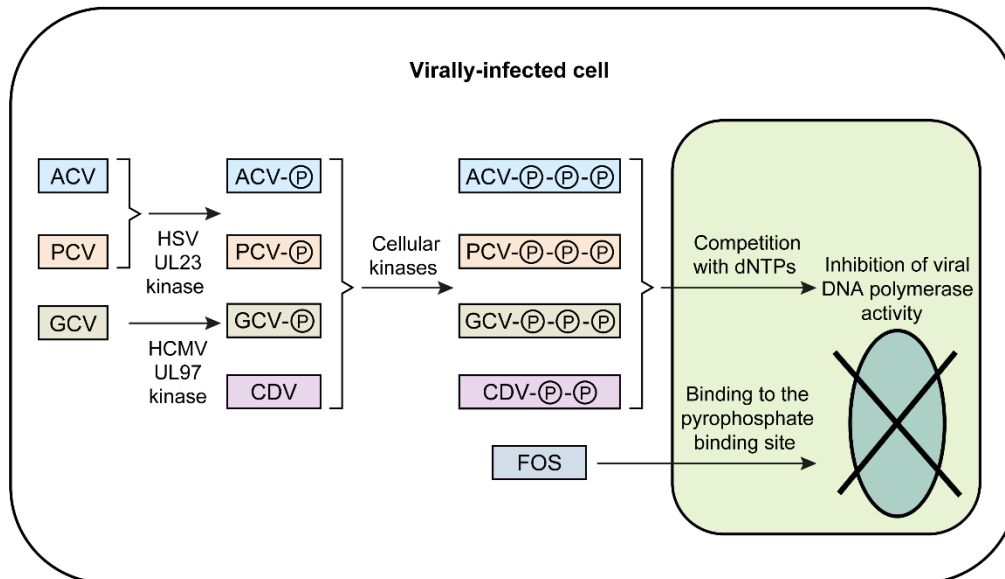


Fig. 6: Mechanisms of action of the different classes of antiviral agents. The nucleosides analogs such as acyclovir (ACV), penciclovir (PCV) and ganciclovir (GCV) must be first phosphorylated by the viral thymidine kinase (TK) or the UL97 protein kinase and then by cellular kinases to be converted into their active form. The acyclic nucleoside phosphonate derivatives such as cidofovir (CDV) must be phosphorylated by cellular kinases only to be active. The resulting triphosphate form of nucleotide analogues and diphosphate form of phosphonate derivatives compete with deoxynucleotide triphosphate (dNTPs) to inhibit the viral replication. The pyrophosphate analogue foscarnet (FOS) directly inhibits the activity of the viral DNA polymerase. Key: $\textcircled{\text{P}}$ represents one phosphate group.

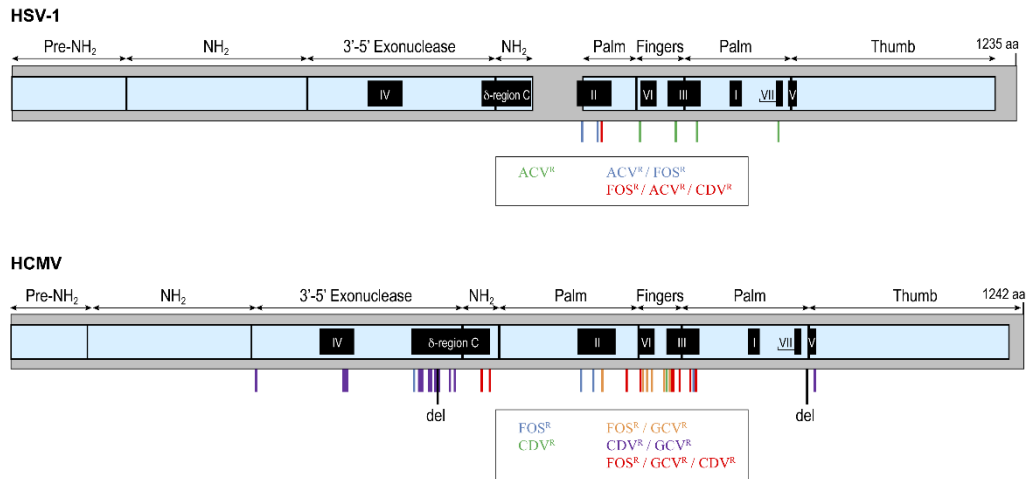


Fig. 7: Confirmed drug resistance mutations identified in UL30 and UL54 DNA polymerases of HSV-1 and HCMV clinical isolates, respectively. Conserved regions among the Herpesviridae DNA polymerases are represented by the black boxes. The roman numbers (I to VII) and δ -region C corresponding to each of these regions are indicated inside the boxes. The structural domains are localized for both enzymes. For HSV-1, mutations in UL30 DNA polymerase conferring resistance to acyclovir (ACV^R) and/or foscarnet (FOS^R) are represented. For HCMV, mutations in UL54 DNA polymerase conferring resistance to ganciclovir (GCV^R), foscarnet (FOS^R) and/or cidofovir (CDV^R) are shown. Colored bars (|) correspond to amino acid (aa) substitutions. del, deletion of codon 524 and codons 981-982.