

Université de Sherbrooke

**Étude du mécanisme moléculaire de résistance antivirale du cytomégalovirus humain  
et des mutations de l'ADN polymérase UL54 qui lui sont associées.**

Par  
Andréa Allaire  
Programme de Biochimie

Mémoire présenté à la Faculté de médecine et des sciences de la santé  
en vue de l'obtention du grade de maître ès sciences (M. Sc.)  
en Biochimie

Sherbrooke, Québec, Canada  
Octobre, 2017

Membres du jury d'évaluation  
Pr. Martin Bisailon, Département de Biochimie  
Pr. Pierre Lavigne, Département de Biochimie  
Pr. Brendan Bell, Département de Microbiologie et d'Infectiologie

© Andréa Allaire, 2017

## RÉSUMÉ

### **Étude du mécanisme moléculaire de résistance antivirale du cytomégalo­virus humain et des mutations de l'ADN polymérase UL54 qui lui sont associées.**

Par  
Andréa Allaire  
Programme de Biochimie

Mémoire présenté à la Faculté de médecine et des sciences de la santé en vue de l'obtention du diplôme de maître ès sciences (M.Sc.) en Biochimie, Faculté de médecine et des sciences de la santé, Université de Sherbrooke, Sherbrooke, Québec, Canada, J1H 5N4

Le cytomégalo­virus humain (HCMV), un membre de la famille des *Herpesviridae*, cause des infections latentes chez plus de la moitié (60 %) de la population dans les pays développés. Cette proportion peut atteindre jusqu'à la totalité (100%) de la population dans les pays en voie de développement. Sa primo-infection chez le fœtus en développement ou chez le nouveau-né ainsi que sa réactivation chez les individus immunodéprimés sont associés à de nombreux cas de morbidité et de mortalité. L'infection congénitale est l'infection à HCMV la plus importante et engendre un coût économique de plus de 2 milliards de dollars américains chaque année. Aucun vaccin n'est approuvé à ce jour pour la prévention de l'infection à HCMV. Cependant, des antiviraux sont disponibles pour le traitement de cette infection. Parmi ceux-ci, on retrouve trois types d'analogues : un analogue nucléosidique (ganciclovir), un analogue nucléosidique monophosphaté (cidofovir) et un analogue du pyrophosphate inorganique (foscarnet). Ces antiviraux ont tous comme cible commune l'ADN polymérase virale. Toutefois, de nombreuses souches résistantes à ces antiviraux sont retrouvées chez certains individus infectés. Ces souches résistantes présentent de nombreuses mutations au niveau du gène viral qui encode pour l'ADN polymérase UL54 du cytomégalo­virus. Jusqu'à présent dans la littérature, seule l'association entre les mutations et la résistance antivirale a été proposée. Les travaux présentés dans ce mémoire visent à mieux comprendre l'effet des mutations sur la liaison des antiviraux à la polymérase et donc éventuellement élucider le mécanisme moléculaire de résistance aux antiviraux chez ce pathogène. Cette recherche a permis de déterminer que les mutations, associées à la résistance antivirale, affectent la liaison optimale des désoxynucléotides (dNTPs) et bloquent la liaison de l'antiviral (foscarnet) à l'ADN polymérase virale UL54. Toutefois, ces mutations n'affectent pas la liaison de l'ADN simple brin à celle-ci. De plus, selon l'étude présentée ici, les mutations n'affectent pas le repliement global de l'ADN polymérase virale. Le mécanisme de résistance moléculaire semble donc avoir un impact très local sur la protéine. Peu d'informations sur la structure de cette polymérase virale sont disponibles à ce jour dans la littérature. Il serait donc pertinent d'élucider la structure cristallographique de cette polymérase pour éventuellement étudier l'effet structural des mutations sur la polymérase et ainsi élucider le ou les mécanismes moléculaires de résistance aux antiviraux.

Mots clés : virus, cytomégalo­virus humain, ADN polymérase UL54, résistance antivirale, antivirus, infection virale, infection congénitale

# TABLE DES MATIERES

<b>Résumé</b> .....	<b>ii</b>
<b>Table des matières</b> .....	<b>iii</b>
<b>Liste des figures</b> .....	<b>vi</b>
<b>Liste des tableaux</b> .....	<b>viii</b>
<b>Liste des abréviations</b> .....	<b>ix</b>
<b>Introduction</b> .....	<b>1</b>
<b>1. CYTOMÉGALOVIRUS HUMAIN</b> .....	<b>1</b>
1.1 Particule virale.....	1
1.1.1 Structure du virion.....	2
1.1.2 Génome viral.....	3
1.2 Cycle de réplication virale.....	4
1.2.1 Entrée du virus dans la cellule hôte.....	6
1.2.2 Expression du génome viral.....	6
1.2.3 Réplication du génome viral.....	7
1.2.4 Maturation et bourgeonnement.....	8
1.2.5 Latence.....	8
1.3 Transmission.....	9
1.3.1 Transmission verticale.....	10
1.3.2 Transmission horizontale.....	10
1.4 Infection à cytomégalovirus humain.....	11
1.4.1 Infection – Patients immunocompétents.....	11
1.4.2 Infection – Patients immunodéficients.....	11
1.4.3 Infection congénitale.....	12
1.5 Diagnostic.....	13
1.5.1 Méthodes non-moléculaires.....	13
1.5.2 Méthodes moléculaires.....	14
1.6 Vaccins.....	15
1.6.1 Vivant atténué.....	15
1.6.2 Vivant sous-unitaire.....	16
1.6.3 Vecteur viral.....	16
1.7 Antiviraux.....	17
1.6.1 Antiviraux approuvés.....	17

1.6.1.1 Ganciclovir.....	18
1.6.1.2 Valganciclovir.....	20
1.6.1.3 Cidofovir.....	20
1.6.1.4 Valacyclovir.....	21
1.6.1.5 Foscarnet.....	22
1.6.1.6 Fomivirsen.....	23
1.6.2 Antiviraux en études cliniques.....	24
1.6.2.1 Maribavir.....	24
1.6.2.2 Letermovir.....	25
1.6.2.3 Cyclopropavir.....	26
<b>2. ADN POLYMÉRASE VIRALE.....</b>	<b>27</b>
2.1 Fonctions et généralités.....	29
2.2 Modèles d'homologie structurale.....	31
2.3 Implication dans la résistance antivirale.....	33
<b>Hypothèse et objectif de recherche.....</b>	<b>35</b>
<b>Hypothèse.....</b>	<b>35</b>
<b>Objectif principal.....</b>	<b>35</b>
Sous-Objectifs.....	35
<b>Matériel et méthodes.....</b>	<b>36</b>
<b>Protéines recombinantes.....</b>	<b>36</b>
Génération des différents clones (clonage moléculaire).....	36
Mutagenèse dirigée.....	36
Expression des protéines recombinantes.....	37
Purification des protéines recombinantes.....	37
<b>Repliement des protéines recombinantes.....</b>	<b>39</b>
<b>Interaction à l'ADNsb et au dNTP des protéines recombinantes.....</b>	<b>39</b>
<b>Activité enzymatique des protéines recombinantes.....</b>	<b>41</b>
<b>Interaction de l'antiviral FOS aux protéines recombinantes.....</b>	<b>41</b>
<b>Résultats.....</b>	<b>42</b>
<b>Production des différentes protéines recombinantes de l'ADN polymérase UL54.....</b>	<b>42</b>
Expression et purification des différentes protéines recombinantes.....	44
<b>Repliement des différentes protéines recombinantes.....</b>	<b>45</b>
<b>Interaction des différentes protéines recombinantes à l'ADNsb et au dNTP.....</b>	<b>47</b>
<b>Activité enzymatique de la protéine recombinante UL54(293-953)WT C-His<sub>6</sub>.....</b>	<b>49</b>

<b>Interaction des différentes protéines recombinantes à l'antiviral FOS.....</b>	<b>51</b>
<b>Discussion.....</b>	<b>54</b>
<b>Comparaison avec une autre ADN polymérase virale <math>\alpha</math> : UL30.....</b>	<b>57</b>
<b>Impacts de ma recherche .....</b>	<b>58</b>
<b>Limitations du projet.....</b>	<b>59</b>
<b>Perspectives.....</b>	<b>60</b>
<b>Remerciements.....</b>	<b>65</b>
<b>Liste des références .....</b>	<b>66</b>
<b>Annexes .....</b>	<b>85</b>

## LISTE DES FIGURES

Figure 1 – Taxonomie de l'ordre <i>Herpesvirales</i> .....	1
Figure 2 – Représentation schématique de la particule virale du cytomégalo virus humain. ....	3
Figure 3 – Représentation schématique du génome viral de HCMV. ....	4
Figure 4 – Schéma récapitulatif du cycle de réplication virale de HCMV.....	5
Figure 5 – Mécanisme d'action de l'antiviral ganciclovir, cidofovir et foscarnet.....	23
Figure 6 – Schéma de l'ADN polymérase virale UL54 et les différentes mutations ponctuelles conférant à HCMV une résistance antivirale. ....	28
Figure 7 – Changements de conformation séquentiels de l'ADN polymérase de type $\alpha$ lors de la polymérisation. ....	30
Figure 8 – Modèle d'homologie de l'ADN polymérase virale UL54 fait à partir de l'ADN polymérase du bactériophage RB69 (PDB 1IH7). ....	32
Figure 9 – Modèle d'homologie de l'ADN polymérase virale UL54 fait à partir de l'ADN polymérase du virus Herpès Simplex 1 (PDB 2GV9).....	33
Figure 10 – Modèle d'homologie de l'ADN polymérase UL54 complète et tronquée. ....	42
Figure 11 – Mutations ponctuelles dans le gène codant pour l'ADN polymérase UL54 et leur(s) résistance(s) qui leur sont associées.....	43
Figure 12 – Expression et purification des différentes protéines recombinantes de l'ADN polymérase UL54. ....	45
Figure 13 – Repliement des différentes protéines recombinantes de l'ADN polymérase UL54 analysé par spectropolarimétrie de dichroïsme circulaire. ....	46
Figure 14 – Interaction des différentes protéines recombinantes d'ADN polymérase UL54 avec l'ADNsb. ....	47
Figure 15 – Interaction des différentes protéines recombinantes d'ADN polymérase UL54 avec le dATP. ....	49
Figure 16 – Essai de polymérisation avec la protéine recombinante de l'ADN polymérase UL54 tronquée.....	50

Figure 17 – Interaction de l’antiviral foscarnet avec les différentes protéines recombinantes de l’ADN polymérase UL54. ....	51
Figure 18 – Essai préliminaire de l’activité de polymérisation de l’ADN polymérase recombinante complète de type sauvage. ....	61
Figure 19 – Essai préliminaire de l’interaction du FOS avec l’ADN polymérase UL54 recombinante de type sauvage en présence d’ADNsb. ....	63

## **LISTE DES TABLEAUX**

Tableau 1 – Agents antiviraux approuvés et utilisés pour le traitement de l’infection à HCMV. ....	18
Tableau 2 – Agents antiviraux en études cliniques.....	27
Tableau 3 – Constantes d’association et de dissociation de l’interaction de l’antiviral foscarnet avec les différentes protéines recombinantes de l’ADN polymérase UL54. ....	53

## LISTE DES ABRÉVIATIONS

°	Degré
µg	Microgramme
µL	Microlitre
µM	Micromolaire
6xHis	Étiquette composée de 6 histidines
AC	Complexe cytoplasmique d'assemblage viral
ACV	Acyclovir
ACV-PPP	Acyclovir triphosphaté
ADN	Acide désoxyribonucléique
ADNdb	Acide désoxyribonucléique double brin
ADNsb	Acide désoxyribonucléique simple brin
ARN	Acide ribonucléique
Arg	Arginine
BSA	Albumine de sérum bovin/Bovine Serum Albumin
CD	Dichroïsme circulaire/Circular dichroism
CD8+	Antigène de surface des cellules T cytotoxiques/ cluster de différenciation 8
CD14+	Glycoprotéine à la surface des monocytes/ cluster de différenciation 14
CD34+	Glycoprotéine à la surface des HPCs/ cluster de différenciation 34
CDV	Cidofovir
CDV-PP	Cidofovir diphosphate
CDV <sup>R</sup>	Résistance au cidofovir
CMV	Cytomégalovirus
CPE	Effet cytopathique/Cytopathic effect
CPV	Cyclopropavir
dATP	Désoxyadénosine triphosphate

dCTP	Désoxycytosine triphosphate
dGTP	Désoxyguanosine triphosphate
dNTP	Désoxynucléotide triphosphate
dNTP $\alpha$ S	Deoxynucléotide-5'-O-(1-thiotriphosphate)
dTTP	Désoxythymidine triphosphate
DE	Gènes précoces retardés/delayed early genes
DMSO	Diméthylsulfoxyde
DO	Densité optique
DpnI	Enzyme de restriction isolé de <i>Diplococcus pneumoniae</i>
EBV	Virus d'Epstein-Barr/Epstein-Barr Virus
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
ERGIC	Compartiment intermédiaire RE-Golgi/ER-Golgi Intermediate compartment
FDA	Food and Drug Administration
FOM	Fomivirsén
FOS	Foscarnet
FOS <sup>R</sup>	Résistance au foscarnet
gB	Glycoprotéine B
gp43	ADN polymérase de type $\alpha$ du bacteriophage RB69
GCV	Ganciclovir
GCV-PPP	Ganciclovir triphosphaté
GCV <sup>R</sup>	Résistance au ganciclovir
gH	Glycoprotéine H de HCMV
gL	Glycoprotéine L de HCMV
HCMV	Cytomégalovirus humain/Human cytomegalovirus
HP1	Hélicase-Primase 1
HP2	Hélicase-Primase 2
HP3	Hélicase-Primase 3
HPCs	Cellules progénitrices hématopoïétiques/ Hematopoietic progenitor cells
HRP	Peroxydase de raifort/Horseradish Peroxidase,

HT[V]	Tension de l'appareil en voltage/High Tension (voltage)
ICP36	Protéine accessoire à la polymérase UL54
ICTV	International Committee on Taxonomy of Viruses
IE	Gènes précoces immédiats/immediate early genes
IE-1	Gènes précoces immédiats 1/immediate early genes 1
IE-2	Gènes précoces immédiats 2/immediate early genes 2
IFI16	Régulateur transcriptionnel cellulaire
IgG	Immunoglobuline G
IgM	Immunoglobuline M
IPTG	Isopropyl $\beta$ -D-1-thiogalactopyranoside
IRL	Région répétée longue interne/internal repeat long
IRS	Région répétée courte interne/internal repeat short
K <sub>a</sub>	Constante d'association
K <sub>d</sub>	Constante de dissociation
kpb	Kilo paire de base
kDa	Kilo Dalton
L	Gènes tardifs/Late genes
L	Litre
LB	Milieu de culture <i>Lysogeny Broth</i>
LTV	Letermovir
Lys	Lysine
M	Molaire
MBV	Maribavir
MF59	Adjuvant utilisé dans certain vaccin
MgCl <sub>2</sub>	Chlorure de magnésium
MiEP	Promoteur majeur viral «immediate early»/Major Immediate early promotor
miRNA	MicroARN/MicroRNA
min	Minute
mL	Millilitre
Mol. Ellip.	Éllipticité molaire/Molar ellipticity

mRNA	ARN messenger/Messenger RNA
MRC-5	Fibroblastes de poumons humains normaux
NaCl	Chlorure de sodium
ND	Non-déecté
ng	Nanogramme
nM	Nanomolaire
nm	Nanomètre
nt	Nucléotide
O/N	Toute la nuit/Overnight
<i>ori</i> Lyt	Origine de répliation lytique de HCMV
PAGE	Électrophorèse sur gel polyacrylamide/Polyacrylamide gel electrophoresis
PCR	Réaction de polymérisation en chaîne/ Polymerase chain reaction
PDB	Protein data bank
Pfu	ADN polymérase isolé de <i>Pyrococcus furiosus</i>
pp65	Protéine du tégument de HCMV
qPCR	PCR en temps réel/quantitative PCR
RE	Réticulum endoplasmique
rpm	Tour par minute/revolution per minute
RT-PCR	PCR à partir d'une réaction de transcription inverse/Reverse transcription polymerase chain reaction
SDS	Dodécylsulfate de sodium
sec	Seconde
siRNA	Petit ARN interférant/Small interfering RNA
TOS	Transplanté d'organe solide
TP	Température pièce
Tris-HCl	2-amino-2-(hydroxyméthyl)-1,3-propanediol
TRL	Région répétée longue terminale/terminal repeat long
TRS	Région répétée courte terminale/terminal repeat short
U	Unité
UL	Région unique longue du génome viral de HCMV

UL44	Protéine accessoire d'UL54, augmente la processivité
UL54	ADN polymérase de HCMV
UL56	Protéine du complexe terminase de HCMV
UL89	Protéine du complexe terminase de HCMV
UL97	Sérine/Thréonine kinase de HCMV
US	Région unique courte (short) du génome viral de HCMV
VACV	Valacyclovir
VGCV	Valganciclovir
VHH-6	Virus herpès humain 6
VHS-1	Virus herpès simplex 1
VZV	Virus varicelle-zona/Varicella zoster virus
WT	Type sauvage/Wild type

# INTRODUCTION

## 1. CYTOMÉGALOVIRUS HUMAIN

### 1.1 Particule virale

Le cytomégalo­virus humain (HCMV), isolé pour la première fois en 1955 (Smith, 1956), a été nommé «cytomégalo­virus» par sa capacité d’hypertrophier les cellules infectées. Ce virus est un membre de la famille des *Herpesviridae* appartenant à la sous-famille des  $\beta$ -*Herpesvirinae*. Bien que la communauté scientifique utilise le terme cytomégalo­virus pour parler de HCMV, ce terme désigne en fait le genre auquel le virus appartient. En effet, comme le montre la figure 1, l’espèce exacte qui est étudiée et qui sera discutée dans ce mémoire est le virus de l’herpès humain 5 (Davison et al., 2009). Ce virus détient les structures de base des virions de la famille des *Herpesviridae*. Typiquement, ces virions possèdent une enveloppe constituée d’une bicouche lipidique contenant les glycoprotéines virales de surface essentielles à l’entrée du virus dans la cellule hôte (gB et gH). Cette enveloppe entoure un compartiment amorphe appelé le tégument qui contient la nucléocapside. Cette capside icosaédrique est habituellement composée de 162 capsomères et contient un génome d’ADN double brin linéaire de taille volumineuse (130-250 kpb) (Liu and Zhou, 2007).

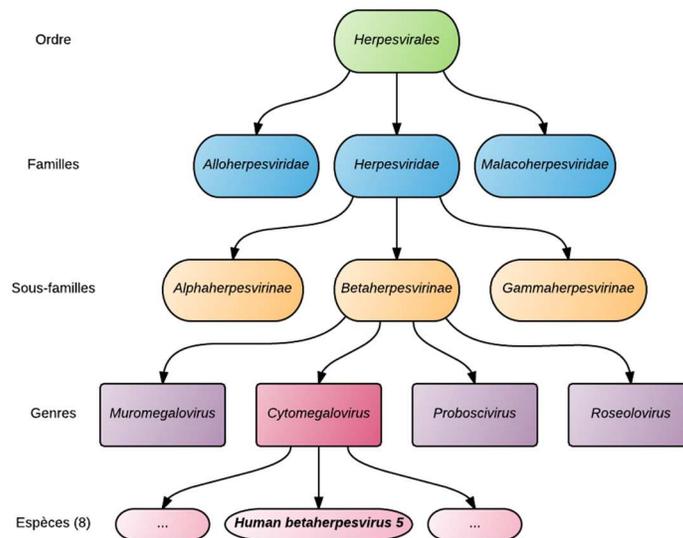


Figure 1 - Taxonomie de l’ordre *Herpesvirales*.

Classification et nomenclature proposée par l’*International Committee on Taxonomy of Viruses* (ICTV). Adaptée de (Davison et al., 2009).

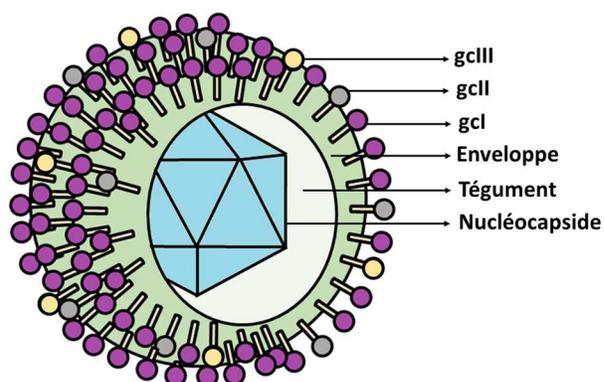
### *1.1.1 Structure du virion*

Le HCMV est un virus enveloppé dont l'enveloppe consiste en une bicouche lipidique dérivée des membranes endosomales (Tandon and Mocarski, 2012; Tooze et al., 1993), de la membrane du réticulum endoplasmique (RE) ou du compartiment intermédiaire RE-Golgi (ERGIC) (Crough and Khanna, 2009; Tandon and Mocarski, 2012). Cette machinerie sécrétoire (RE, Golgi, machinerie endosomale) forme, dans les cellules infectées, le complexe cytoplasmique d'assemblage viral (AC). C'est dans ce complexe que la nucléocapside acquière les protéines du tégument et son enveloppe virale (Tandon and Mocarski, 2012). Cette enveloppe présente à sa surface trois complexes majeurs de glycoprotéines : gcI (gB), gcII (gM :gN) et gcIII (gH :gL). Ces complexes sont essentiels à l'attachement et à l'entrée du virus dans la cellule hôte (Britt, 2007; Isaacson and Compton, 2009). D'autres complexes glycoprotéiques, comme gH :gL :gO et gH :gL :gUL128 :gUL131A, se retrouvent à la surface de l'enveloppe virale en abondance moins importante (Revello and Gerna, 2010). Selon l'analyse du génome viral, il est prédit que HCMV pourrait encoder pour plus de 65 glycoprotéines (Britt & Mach, 1996).

Sous l'enveloppe se retrouve un compartiment amorphe appelé le tégument. Ce compartiment contient au moins 38 protéines (Kalejta, 2008). Ces protéines du tégument possèdent différentes fonctions et jouent différents rôles lors de l'infection. Étant encodées par le virus, ces protéines sont très immunogéniques. La protéine du tégument la plus abondante est pp65 (Mocarski et al., 2013). Cette protéine phosphorylée, encodée par le gène UL83, migre initialement au noyau de la cellule infectée où elle promeut l'activation du promoteur majeur viral «immediate early» (MiEP) via l'interaction avec IFI16, un régulateur transcriptionnel cellulaire (Cristea et al., 2010). La protéine pp65 sera, à un stade plus avancé de l'infection, relocalisée dans le cytoplasme où elle jouera différents rôles impliquant évidemment l'infection, mais aussi l'assemblage du virion (Smith et al., 2014). pp65 interagit directement avec une autre protéine importante du tégument, soit avec une sérine/thréonine kinase encodée par le gène UL97 (Kamil and Coen, 2007). Cette protéine kinase UL97 a été initialement identifiée par sa capacité à phosphoryler un antiviral utilisé contre l'infection à HCMV, le ganciclovir (Littler et al., 1992). Comme plusieurs autres protéines du tégument, elle possède différents rôles. Parmi ceux-ci, on retrouve sa capacité à redistribuer les

protéines du tégument du noyau au AC. Cela permet l'assemblage adéquat du virion (Prichard et al., 2005).

La nucléocapside quant à elle est composée entre autres de quatre protéines spécifiques à l'espèce de la famille des *Herpesviridae*. Pour HCMV, ces quatre protéines (UL46, UL80.5, UL85 et UL104) forment 162 capsomères, soit 150 hexamères et 12 pentamères (Gibson, 2008). UL46, la petite protéine de la capside, est essentielle à la réplication (Borst et al., 2001).



**Figure 2 - Représentation schématique de la particule virale du cytomégalovirus humain.**

La particule virale du cytomégalovirus humain possède une nucléocapside icosaédrique composée de 162 capsomères. Cette capside contient le génome viral qui se retrouve sous forme d'ADN linéaire double brin (~ 235 kpb). Elle est entourée d'un compartiment amorphe, le tégument. Ce dernier est quant à lui entouré d'une enveloppe en bicouche lipidique possédant les complexes majeurs de glycoprotéines, gcl, gcII et gcIII. Adaptée de (Gibson, 2008).

### 1.1.2 Génome viral

La nucléocapside de HCMV entoure un génome viral volumineux composé d'ADN double brin (ADNdb) d'environ 235 kilo paire de base (kpb) (voir figure 3). Ce génome est composé de deux régions uniques, une longue (UL) et une courte (US). Celles-ci se retrouvent encadrées de deux régions répétées inversées longues et courtes, terminales (TRL et TRS) ou internes (IRL et IRS). Une portion de la séquence des régions TRL et TRS se retrouve aussi dans les régions IRL et IRS mais de façon inversée. Cet arrangement permet l'isomérisation du génome durant la réplication (Murphy and Shenk, 2008). Ces mêmes séquences possèdent les signaux de clivage et d'empaquetage du génome lors de l'assemblage du virion. Dans la région IRS et la région TRS, encadrant la région US, se

retrouve la séquence des gènes précoces immédiats (IE). Ces gènes sont bien conservés entre les différentes souches de HCMV (Mocarski et al., 2013). Le génome de ce virus contient aussi une origine de réplication (*ori* Lyt). Le consensus actuel, lorsque l'on compare différentes souches de HCMV, prédit que le virus produit au moins 167 protéines virales, 4 long ARN non-codants et 23 micro ARN (miRNA) (Mocarski et al., 2013).

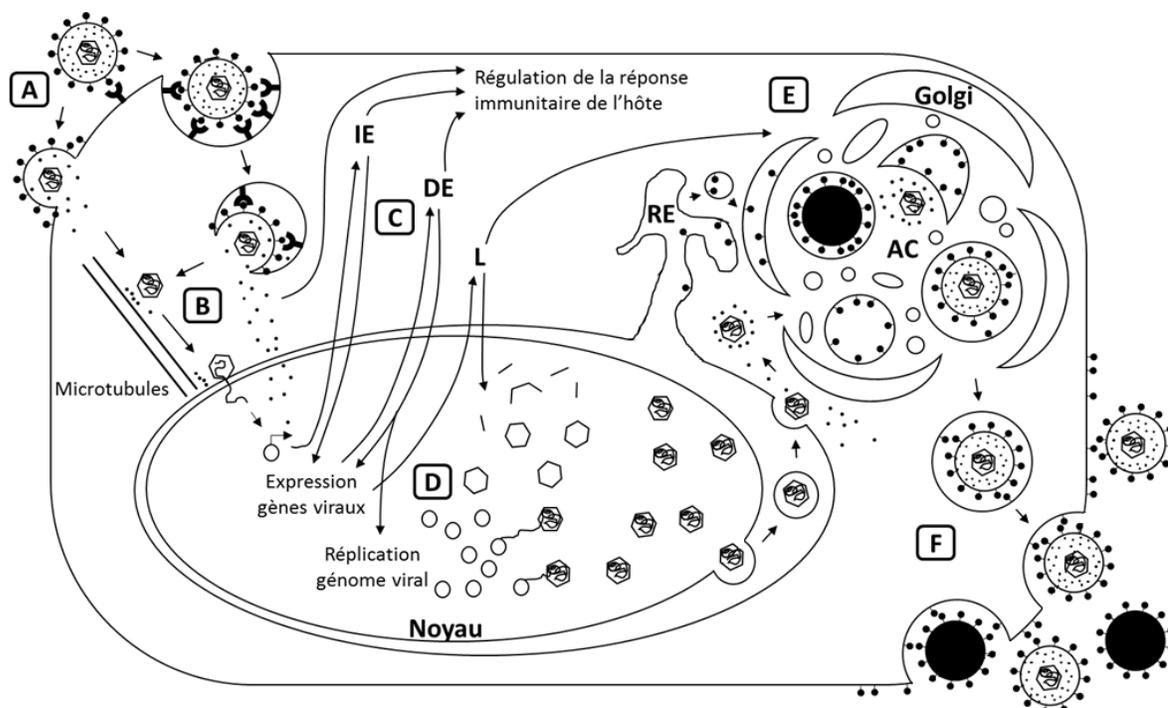


**Figure 3 – Représentation schématique du génome viral de HCMV.**

Le génome de HCMV est sous forme d'ADN double brin linéaire d'environ 235 kilo paire de base (kpb). Il est composé de deux régions uniques, une longue (UL) et une courte (US). Ces deux régions sont encadrées par une région répétée inversée terminale longue et courte (TRL et TRS) et par une région répétée inversée interne longue et courte (IRL et IRS). Adaptée de (Crough and Khanna, 2009).

### ***1.2 Cycle de réplication virale***

Possédant les structures de base des virions de la famille des *Herpesviridae*, HCMV possède aussi un cycle répliatif comprenant les étapes classiques retrouvées chez les virus herpétiques (voir figure 4). D'abord, il y a l'entrée du virus dans la cellule hôte via l'attachement du virus à la membrane plasmique cellulaire. Ensuite, il y a l'expression du génome viral qui a transloqué du cytoplasme au noyau de la cellule hôte. C'est dans le noyau que le génome viral sera répliqué. Finalement, il y a maturation et bourgeonnement des particules virales. Le virus pourra, d'une part, se propager et infecter les cellules voisines et d'autre part entrer en phase de latence au sein de l'hôte pour ensuite se réactiver lors d'un affaiblissement du système immunitaire.



**Figure 4 – Schéma récapitulatif du cycle de réplication virale de HCMV.**

[A] L'attachement de la particule infectieuse HCMV est réalisé via l'interaction des glycoprotéines à la surface de l'enveloppe virale avec les récepteurs à la surface de la cellule hôte. L'entrée du virus s'effectue par endocytose ou par fusion de l'enveloppe virale avec la membrane plasmique de la cellule hôte. [B] Le relargage de la nucléocapside et des protéines du tégment survient dans le cytoplasme. Le transport de la capside au noyau de la cellule s'effectue via l'interaction des protéines du tégment à la surface de la capside et la machinerie microtubulaire. Au niveau du pore nucléaire, l'ADNdb viral linéaire est injecté. Le génome viral se circularise une fois dans le noyau. [C] L'expression des gènes viraux s'effectue de façon séquentielle. D'abord, il y a l'expression des gènes précoces immédiats (IE), suivi des gènes précoces retardés (DE) et finalement des gènes tardifs (L). Ensemble, ils vont permettre une régulation de différents éléments autant cellulaires que viraux comme la régulation de l'expression des gènes viraux, de la réplication du génome viral et de la réponse immunitaire de l'hôte. [D] La réplication du génome viral a lieu. Les produits de gènes L vont initier l'assemblage de la nucléocapside dans le noyau. [E] Dans le complexe cytoplasmique d'assemblage viral (AC), la nucléocapside acquiert les protéines du tégment et l'enveloppe virale. [F] Le relâchement de particules virales et de corps denses (particules non-infectieuses) s'effectue par bourgeonnement. Adaptée de (Jean Beltran and Cristea, 2014).

### *1.2.1 Entrée du virus dans la cellule hôte*

L'étape initiale de l'infection du virus à HCMV est évidemment l'attachement de ce dernier à la cellule hôte. Le contact initial avec la cellule s'établit via les protéoglycanes de la membrane plasmique (Kinzler and Compton, 2005). Ensuite, des interactions spécifiques entre les glycoprotéines majeures de l'enveloppe et les récepteurs cellulaires de la membrane plasmique vont permettre l'entrée du virus dans la cellule. En effet, l'interaction des protéines gB et gH :gL aux récepteurs cellulaires provoque les événements qui produisent la fusion de l'enveloppe virale et de la membrane cellulaire ou l'endocytose (Isaacson and Compton, 2009). La combinaison de différents complexes de gH :gL avec d'autres glycoprotéines majeures permettent l'entrée du virus dans différents types cellulaires selon le complexe formé (Revello and Gerna, 2010; Ryckman et al., 2008). Lors de l'entrée du virus au cytoplasme, les protéines du tégument, se retrouvant à la surface de la capsid, interagissent avec les microtubules (machinerie microtubulaire). Cela permet à la capsid virale d'atteindre l'enveloppe nucléaire (Jean Beltran and Cristea, 2014). Une fois que les protéines du tégument interagissent avec la face plasmique du complexe du pore nucléaire, il y a ouverture de la capsid et l'ADNdb linéaire pénètre dans le noyau (Strang, 2015). La protéine du tégument UL47, en interagissant avec d'autres protéines majeures de la capsid, permettrait ce relâchement du génome viral dans le noyau de la cellule infectée (Bechtel and Shenk, 2002). Une fois au noyau, l'ADN viral se circularise (McVoy and Adler, 1994) et la réplication ainsi que l'expression du génome viral a lieu.

### *1.2.2 Expression du génome viral*

L'expression des gènes viraux s'effectue de façon séquentielle au fur et à mesure que l'infection progresse. L'ARN polymérase II de la cellule hôte et ses composantes annexes contrôlent la transcription du génome viral. Cette polymérase est transactivée par des protéines virales. La traduction quant à elle dépend des ribosomes cellulaires (Stinski and Meier, 2007). Les premiers gènes à être exprimés sont, comme leur nom l'indique, les gènes précoces immédiats (immediate early; IE). L'expression de ces gènes prépare la cellule hôte à la réplication et à l'expression du génome viral (Stinski and Meier, 2007). Les produits de ces gènes permettent de moduler des éléments autant cellulaires que viraux. Ils modulent la réponse immunitaire de l'hôte, régulent l'expression des gènes viraux et initient la réplication

du génome viral (Jean Beltran and Cristea, 2014). L'expression de ces gènes IE est dépendante de la machinerie cellulaire de l'hôte et indépendante de la synthèse *de novo* de protéines virales ou cellulaires (Boshart et al., 1985). La présence de protéines du tégment (pp71 et UL69), provenant de la particule virale infectant la cellule hôte, permet l'activation du promoteur majeur viral «immediate early» (MiEP) (Mocarski et al., 2013; Saffert and Kalejta, 2006). L'expression des gènes IE est alors possible. Ces gènes codent principalement pour des protéines régulatrices qui sont nécessaires à l'activation des gènes précoces retardés (delayed early; DE). Les gènes DE encodent pour des protéines essentielles à la synthèse de l'ADN viral (LaFemina and Hayward, 1986). Les produits de ces gènes DE permettent aussi le maintien de la cellule hôte comme un environnement optimal à l'expression et la réplication du génome viral. L'expression des gènes DE permet aussi l'activation des gènes tardifs (late; L). L'expression de ces derniers gènes est dépendante de la réplication de l'ADN viral. En effet, l'expression des gènes L est complètement bloquée lorsque la synthèse de l'ADN viral est inhibée (Isomura and Stinski, 2013). Les gènes L codent principalement pour des protéines essentielles à l'assemblage de la capsid, à l'encapsidation du génome viral, à la tégmentation initiale et à la sortie nucléaire des particules virales (Tandon and Mocarski, 2012). Les produits des gènes L permettent donc la maturation des particules virales (Kalejta, 2008).

### *1.2.3 Réplication du génome viral*

Une fois le génome viral entré dans le noyau de la cellule hôte, celui-ci se circularise (McVoy and Adler, 1994). La synthèse de l'ADN viral s'initie à l'origine de réplication (*ori* Lyt) (Anders et al., 1992). Elle s'effectue de façon continue créant une longue chaîne d'ADN qui possède plusieurs unités répétées du génome viral appelées concatémères (Mocarski and Roizman, 1982). HCMV produit 6 protéines virales qui formeront le complexe de réplication (Wen and Wang, 2009). Le gène UL54 encode pour l'ADN polymérase virale qui permet la polymérisation de nouveaux brins d'ADN à partir d'un brin matrice (Heilbronn et al., 1987). Le produit du gène UL44 est son facteur de processivité (Ertl and Powell, 1992). En effet, il est nécessaire au maintien de l'interaction de cette polymérase au brin matrice. Le gène UL57, quant à lui, génère une protéine qui lie l'ADN simple brin (ADNsb) empêchant ainsi la renaturation de l'ADNdb (Kemble et al., 1987). Le complexe de

réplication comprend aussi trois hélicase-primase (HP1, HP2 et HP3), encodées par les gènes UL105, UL70 et UL102 respectivement (Pari and Anders, 1993). Ce complexe hélicase-primase permet de séparer le brin d'ADNbd en deux brins d'ADNsb.

#### *1.2.4 Maturation et bourgeonnement*

Avant d'être encapsidé dans la nucléocapside, l'ADN concatémérique doit être clivé en multiples génomes unitaires. Cette étape de clivage est effectuée par le complexe terminase. Ce complexe est composé de la protéine virale UL89 et UL56. Ce même complexe permet l'empaquetage des molécules d'ADN dans la capsid (Buerger et al., 2001). Le produit du gène UL56 lie l'ADN viral au niveau de la séquence signale d'empaquetage (motif *pac*) et effectue le clivage de l'ADN viral concatémérique (Bogner et al., 1998). Il interagit aussi avec la protéine virale UL104 de la capsid. Cette interaction serait la porte d'entrée de la capsid pour le génome viral (Dittmer et al., 2005). Le produit du gène UL89, quant à lui, augmente l'activité ATPase de la protéine UL56 permettant ainsi d'avoir l'énergie nécessaire pour effectuer l'encapsidation (Hwang and Bogner, 2002). Une fois que chacune possède leur molécule d'ADN linéaire, les nucléocapsides transloquent du noyau au cytoplasme via la rupture de la lamina nucléaire (Milbradt et al., 2007). Une fois les nucléocapsides se retrouvant au cytoplasme, de multiples voies cellulaires sont dérégulées pour la formation du virion complet et mature (Moorman et al., 2010). À ce moment de l'infection, au cytoplasme, la machinerie sécrétoire (RE, Golgi et machinerie endosomale) forme le complexe cytoplasmique d'assemblage viral (AC) (Das et al., 2007). C'est dans l'AC que la capsid acquière les protéines du tégument à sa surface ainsi que son enveloppe virale. Les particules infectieuses matures sont alors relâchées, en même temps que les corps denses, dans l'espace extracellulaire (Gibson, 2008). Les virions peuvent désormais infecter les cellules voisines et peuvent aussi entrer en phase de latence au sein de l'hôte.

#### *1.2.5 Latence*

Une fois le cycle de réplication lytique terminé, le HCMV peut entrer en phase de latence. Un des sites de latence est dans la moelle osseuse au niveau des cellules progénitrices hématopoïétiques (HPCs) CD34+. Un autre site de latence du HCMV se retrouve dans le

sang périphérique au sein des monocytes CD14+, soit une des formes prédifférenciées des HPCs (Poole and Sinclair, 2015). Cette phase de latence est le mécanisme principal d'évasion immunitaire de HCMV. Seule une gamme de gènes restreinte est exprimée et aucune particule infectieuse n'est produite. Ces sites de latence permettent le maintien du génome viral chez l'hôte (Nelson and Landais, 2013).

Bien que le virus passe inaperçu durant la phase de latence, HCMV provoque de nombreux changements dans la cellule au niveau de la transcription et la signalisation cellulaire. De plus, il manipule la surveillance immunitaire de l'hôte, la réponse au stress et la mort cellulaire. Le tout est orchestré par l'expression de quelques gènes viraux. Certains miRNA viraux iraient même diminuer l'expression des gènes anti-apoptotiques en ciblant les ARN messagers (mRNA) qui leur sont associés (Poole and Sinclair, 2015). Bien que l'expression du gène précoce immédiat 1 (immediate early 1 : IE-1) soit rapportée durant la latence (Mücke et al., 2014), aucun autre gène lytique majeur viral n'est exprimé durant cette phase. Cette répression au niveau des gènes lytiques majeurs viraux est due à la présence de structures inhibitrices de la chromatine près du promoteur majeur viral «immediate early» (MiEP) (Sinclair and Reeves, 2013).

Lors de la réactivation du virus, les HPCs et les monocytes se différencient en macrophages et en cellules dendritiques. Ce sont ces formes cellulaires différenciées qui produisent les particules infectieuses (Nelson and Landais, 2013). Ensuite, ces particules iront infectées divers organes et leur dissémination dans le sang permet au virus de se transmettre facilement.

### ***1.3 Transmission***

Chez le HCMV, il existe deux voies de transmission. Il y a d'abord la transmission verticale qui est l'infection du fœtus ou du nouveau-né par la mère infectée. Il y a aussi la transmission horizontale, soit l'infection d'un individu naïf (non-infecté) par un individu infecté.

### *1.3.1 Transmission verticale*

La transmission verticale peut se diviser en trois sous-types de transmission : transmission intra-utérine, transmission intra-vaginale et transmission par l'allaitement. La transmission intra-utérine conduit à l'infection du fœtus et peut conduire à des maladies congénitales. Cette transmission peut survenir chez une femme qui contracte une infection primaire durant la grossesse ou aussi chez une femme qui est déjà infectée avant même la conception. Dans ce cas, le virus se réactive durant la grossesse (Malm and Engman, 2007). La transmission lors du premier trimestre semble être celle qui a un plus grand impact sur le fœtus puisque le plus haut taux de maladies congénitales est associé à cette transmission précoce (Mocarski et al., 2013). La transmission intra-vaginale survient lors de l'accouchement de la mère qui excrète des particules virales (Boppana et al., 2001). La transmission par l'allaitement est le mode de transmission verticale le plus fréquent. Plus de 95% des femmes séropositives vont excréter du virus dans leur lait (Jim et al., 2004). Ces deux derniers sous-types de transmission verticale vont simplement contribuer à l'épidémie de l'infection contrairement à la transmission intra-utérine qui, quant à elle, cause des cas de morbidité et de mortalité.

### *1.3.2 Transmission horizontale*

L'infection d'un individu naïf par un individu infecté survient lorsque cet individu est exposé à des fluides corporels. En effet, le HCMV se retrouve excrété dans différents fluides corporels : urine, salive, sang, larmes, sperme, sécrétion cervicale, lait maternel, etc. (Mocarski et al., 2013). Ainsi, l'infection peut survenir via contact direct ou indirect avec un objet récemment contaminé, par exemple. Aussi, il y a évidemment possibilité d'infection lors d'une transplantation d'organe possédant le virus latent ou bien lors d'une transfusion sanguine. Heureusement, cette dernière possibilité d'infection est moins fréquente puisque maintenant tous les spécimens sanguins subissent une déplétion leucocytaire avant que la transfusion ait lieu (de Graan-Hentzen et al., 1989; Sinclair, 2008). La voie de transmission horizontale la plus fréquente est par rapport sexuel (Cannon, 2009).

### ***1.4 Infection à cytomégalovirus humain***

L'infection à HCMV touche une grande partie de la population. En effet, près de la moitié des adultes nord-américains et européens sont infectés par le virus. Cette proportion peut atteindre jusqu'à la totalité de la population dans les pays en voie de développement (Mocarski et al., 2013). En général, l'infection à HCMV est asymptomatique chez les individus en santé ayant un système immunitaire normal. Toutefois, il peut y avoir de graves complications chez les individus ayant un système immunitaire déficient ou chez les femmes enceintes au niveau du fœtus/nouveau-né.

#### ***1.4.1 Infection – Patients immunocompétents***

L'infection à HCMV chez les individus immunocompétents, que ce soit la primo-infection, la ré-infection ou la réactivation du virus, est généralement asymptomatique. Leur système immunitaire contrôle bien l'infection, minimisant ainsi la réactivation du virus et favorisant aussi la phase de latence du virus. Rarement, il peut y avoir une infection symptomatique dite de type mononucléose. Ces individus ayant ce syndrome présentent des symptômes peu spécifiques comme de la fièvre, des malaises, des maux de tête et de la fatigue (Shi and McKenna, 2016). Seulement quelques cas d'individus infectés par HCMV, possédant un système immunitaire normal, ont présenté des complications similaires à ceux observées chez des patients immunodéficients. En effet, quelques patients immunocompétents ont présenté des entérites, des maladies thrombotiques et oculaires, des encéphalies, des anémies hémolytiques et des thrombocytopénies (Rafailidis et al., 2008).

#### ***1.4.2 Infection – Patients immunodéficients***

L'infection à HCMV chez les patients immunodéficients provoque de graves complications chez ces individus. En effet, n'ayant pas un système immunitaire apte à contrôler l'infection, le virus peut se répliquer massivement dans l'hôte et infecter différents tissus et organes (Griffiths et al., 2015). Les patients les plus atteints sont les patients transplantés d'organe solide (TOS), les patients sidéens ainsi que les patients cancéreux suivant une chimiothérapie immunosuppressive (Mocarski et al., 2013). L'infection à HCMV chez ces patients peut engendrer différentes maladies à HCMV comme une rétinite, une pneumonie, une hépatite

et même une leucopénie (diminution de la quantité des leucocytes dans le sang) (Ho, 2008). Cette infection chez les patients TOS engendre un coût économique important et la rareté des dons d'organe fait qu'on ne peut être sélectif que pour les organes provenant de donneurs non-infectés (Kim et al., 2000). Si le patient TOS est déjà infecté, la réception de l'organe nécessitant une immunosuppression chez le receveur fait en sorte que le virus peut se réactiver. Chez ces patients TOS, des effets indirects, causés par l'infection, sont aussi observés (Freeman Jr., 2009). En effet, l'infection augmente le risque de rejet de greffe et donne une plus grande susceptibilité aux maladies opportunistes comme les infections bactériennes ou fongiques (Razonable, 2008).

#### *1.4.3 Infection congénitale*

L'infection à HCMV est la cause la plus fréquente d'une infection virale congénitale avec une incidence chez les nouveau-nés d'environ 1%. Seulement 10% de ces infections sont symptomatiques avec des manifestations cliniques classiques telles que l'hépatosplénomégalie, la thrombocytopénie et des maladies du système nerveux central (microcéphalie, chorioretinite, retard psychomoteur ou perte auditive) (Nassetta et al., 2009). Les nouveau-nés infectés de façon asymptomatique peuvent également être à risque de perte auditive dans 7.2% des cas (Fowler et al., 1997). L'infection congénitale à HCMV est la première cause de malformation congénitale non génétique dans les pays développés (Hamilton et al., 2014) et engendre un coût économique de 2 milliards de dollars américains par année aux États-Unis. Il ne serait pas pertinent de tester toutes les femmes pour l'infection à HCMV durant leur grossesse puisque seulement une faible proportion des femmes enceintes transmettent le virus au fœtus et donnent naissance à un enfant infecté (Nassetta et al., 2009). Toutefois, les nouveau-nés ainsi que les enfants sont une source importante de la propagation de l'infection. En effet, excrété dans presque tous les fluides corporels (Mocarski et al., 2013), le virus se transmet facilement surtout chez les enfants où le contact avec leurs fluides corporels peut être plus fréquent. Donc, la faible proportion d'enfants porteurs contribue grandement à l'épidémiologie de l'infection à HCMV.

### *1.5 Diagnostic*

Puisque l'infection chez les patients immunocompétents présente des symptômes peu spécifiques et que l'infection chez les patients immunodéficients ou chez les fœtus/nouveau-nés est associée à de hauts taux de morbidité et de mortalité, l'infection à HCMV nécessite d'être détectée et confirmée en laboratoire.

Deux grandes catégories de tests diagnostiques ont été mises en place au fil du temps. La première catégorie comprend les méthodes diagnostiques dites non-moléculaires. Entre autres, l'isolation ou la culture du virus à partir du sang, de l'urine ou d'autres fluides y est pratiquée. Dans cette catégorie, l'approche est de démontrer la présence d'immunoglobulines (Ig) G et d'IgM, soit d'étudier la sérologie du patient. On va aussi vouloir détecter certaines composantes protéiques du virion via des tests antigéniques et démontrer la présence de cellules caractéristiques porteuses d'inclusion nucléaire en faisant appel à l'histopathologie. La deuxième catégorie de tests diagnostiques comprend les méthodes dites moléculaires. Ces méthodes se concentrent sur la détection ou l'amplification d'acide nucléique de provenance virale.

#### *1.5.1 Méthodes non-moléculaires*

L'une des premières techniques de diagnostic, utilisée durant plusieurs décennies, est la culture virale. Celle-ci consiste à inoculer des cellules, souvent des fibroblastes de poumons humains normaux (MRC-5), dans un fluide corporel qu'on suspecte infecté par HCMV. Après l'inoculation, l'infection est détectée ou non en se référant à la présence ou à l'absence d'effets cytopathiques (CPE). L'identité des îlots viraux observés lors de CPE est confirmée par immunofluorescence avec un antiserum spécifique à CMV (Gleaves et al., 1984). Aussi, il est possible d'effectuer, après l'inoculation, une détection directe ou indirecte d'antigène de HCMV via l'utilisation d'anticorps fluorescents ou de sondes d'ADN biotinylées ou fusionnées à une peroxydase (Razonable et al., 2002). Cette méthode est surtout utilisée pour effectuer un diagnostic post-transplantation (Kotton et al., 2013).

Au fil du temps, la culture virale a été remplacée par l'antigénémie pp65, la protéine la plus abondante du tégument (Fishman, 2013). Cette méthode diagnostique non-moléculaire permet la détection de l'antigène HCMV par immunofluorescence dans les neutrophiles fixés en utilisant un anticorps monoclonal contre pp65 contrairement à un antiserum pouvant être

moins spécifique. Ce test est semi-quantitatif et est surtout utilisé pour le suivi de la réponse au traitement antiviral. Il est aussi utilisé pour évaluer le choix optimal d'antiviraux qui seront utilisés pour la thérapie (Razonable et al., 2002).

Aussi, l'infection à HCMV est diagnostiquée par sérologie. L'utilisation de billes de latex ayant à leur surface des antigènes de HCMV permet la détection d'anticorps IgG et IgM, ciblant HCMV, dans le sérum du patient. Ensuite, ces immunoglobulines sont détectées via un anticorps dirigé contre l'Ig d'espèce humaine et conjugué à une peroxydase de raifort (Horseradish Peroxidase, HRP) (Dioverti and Razonable, 2016). Toutefois, il est à considérer que cette méthode de détection non-moléculaire nécessite que le patient ait une bonne réponse immunitaire (production d'anticorps IgG et IgM). Ainsi, ce test n'est pas favorisé pour le diagnostic de l'infection chez les patients immunodéprimés (Fishman, 2013). La sérologie à HCMV est surtout valable pour confirmer une primo-infection chez le patient immunocompétent. Aussi, elle est utile pour déterminer le statut sérologique d'un donneur et d'un receveur lors d'une transplantation d'organe (Azevedo et al., 2015).

Finalement, l'histopathologie peut être effectuée à la suite d'une biopsie pour démontrer la présence d'antigènes HCMV spécifique ou d'ADN viraux par des techniques *in situ* (Kasprzak et al., 2000). Les tissus habituellement prélevés pour ce genre de diagnostic proviennent du poumon, du système gastro-intestinal et du foie. Cette technique est évidemment moins utilisée puisqu'elle est invasive (Dioverti and Razonable, 2016).

### *1.5.2 Méthodes moléculaires*

La détection de l'infection à HCMV par méthode moléculaire implique l'amplification et/ou la détection d'acides nucléiques. Elle se fait via une réaction de polymérisation en chaîne (PCR) ou via l'hybridation d'une sonde d'ARN sur la séquence de l'ADN viral ciblé (Kotton et al., 2013). La PCR est la plus utilisée puisqu'elle permet d'augmenter la quantité de matériel de départ et ainsi de rendre la détection plus facile, soit au-dessus du seuil de détection de la technique utilisée. Il est donc possible d'effectuer un diagnostic à un stade précoce de l'infection où le titre viral est faible. La PCR est autant utilisée pour détecter la présence d'ARN viraux (RT-PCR) que la présence d'ADN viraux. La PCR en temps réel (qPCR) est la méthode de choix puisqu'elle permet d'avoir les résultats en quelques heures de beaucoup d'échantillons en même temps et ce de façon précise et quantitative (Dioverti

and Razonable, 2016). Cette qPCR peut être réalisée aussi bien sur des échantillons de sang total ou de plasma. Même que pour les foetus, l'infection congénitale peut être diagnostiquée en réalisant la qPCR sur un échantillon de liquide amniotique (Naing et al., 2015). Pour les nouveau-nés, la détection du virus par PCR peut se faire à partir d'un échantillon d'urine ou de salive, soit des prélèvements peu invasifs. Il est connu que le titre viral est un excellent indicatif des chances qu'a un nouveau-né de développer des complications/séquelles à la suite de l'infection (Lanari et al., 2006).

## ***1.6 Vaccins***

Bien qu'il existe différentes méthodes pour diagnostiquer une infection à HCMV, la vaccination contre HCMV serait la façon la plus efficace de prévenir la transmission du virus, de diminuer l'utilisation des antiviraux et ainsi réduire l'émergence de résistances associées à ces derniers. Jusqu'à maintenant aucun vaccin prévenant l'infection à HCMV n'est approuvé. Toutefois plusieurs vaccins sont en cours de développement. Ces différents vaccins peuvent être classés en trois types de vaccins : vivant atténué, vivant sous-unitaire et vecteur viral.

### ***1.6.1 Vivant atténué***

Ce type de vaccin est obtenu en utilisant un virus dont la virulence a été atténuée par des passages successifs en culture cellulaire sur des fibroblastes humains (Wilkinson et al., 2015). Ici, le vaccin engendre l'expression de la totalité ou la quasi-totalité des antigènes de HCMV. Cela permet donc d'induire une réponse immunitaire humorale et cellulaire près de celle d'une infection réelle (Krause et al., 2014). Par contre, ce genre de vaccin engendre des questions de sécurité, surtout lorsqu'il est donné aux femmes enceintes (Mcvoy, 2013). Présentement, deux vaccins ont été développés à partir de deux souches atténuées différentes : Towne et AD169. Le vaccin produit avec la souche Towne a un avantage au niveau de la sécurité puisqu'il possède une délétion de 15 kpb dans la région UL, soit la région nécessaire à l'établissement de la latence (Goodrum et al., 2007). Il est donc impossible pour ce virus d'établir une infection latente (Plotkin and Huang, 1985). Autant le

vaccin produit à partir la souche Towne que celui produit à partir de la souche AD169 sont immunogéniques chez un sujet séronégatif (Mcvoy, 2013). Ils engendrent dans ce cas une réponse immunitaire humorale et cellulaire. Par contre, le titre d'anticorps neutralisant chez ces sujets est plus faible que lors d'une infection réelle. Aussi, chez les patients séropositifs, la vaccination avec Towne n'augmente pas le titre d'anticorps (Plotkin, 2015).

### *1.6.2 Vivant sous-unitaire*

La vaccination à partir d'un vaccin vivant sous-unitaire consiste en l'administration d'un facteur viral immunologique pouvant induire une réponse immunitaire forte et ciblée. Le premier vaccin de ce genre permettait l'expression de la glycoprotéine gB pour ainsi induire une réponse immunitaire humorale produisant des anticorps neutralisants. Avec l'adjuvant MF59, le vaccin sous-unitaire gB est très immunogénique (Griffiths et al., 2011) et semble avoir le potentiel de réduire les cas incidents d'infection maternelle et congénitale (Pass et al., 2009). Par contre, comme les vaccins atténués, aucun anticorps neutralisant ne semble être produit pour bloquer l'infection dans les cellules épithéliales (Cui et al., 2008).

### *1.6.3 Vecteur viral*

Pour le type de vaccin vecteur viral (à ADN), il y a administration de plasmides associés à un adjuvant par un vecteur viral, souvent l'alphavirus, l'adénovirus ou le poxvirus (Mcvoy, 2013). Ces plasmides codent pour des protéines immunogéniques du virus ce qui permet leur expression *in vivo*. Un des vaccins de ce genre en développement contient deux plasmides différents. Un plasmide encode pour gB tandis que l'autre encode pour pp65. L'expression *in vivo* de gB permet la production d'anticorps neutralisant et pp65 permet l'activation des cellules T cytotoxiques CD8+ (McCormick and Mocarski, 2015). Ce vaccin est bien toléré et induit une réponse immunitaire spécifique des lymphocytes T. Par contre, chez les patients séropositifs, il y a absence d'anticorps spécifiques à gB. Toutefois, ce vaccin permettrait de diminuer la virémie chez les patients vaccinés avant la transplantation d'organe (Plotkin, 2015). Jusqu'à maintenant le vaccin à ADN le plus prometteur est un vecteur viral alphavirus possédant les plasmides nécessaires à l'expression de gB et de pp65 fusionnés à IE-1 *in vivo*. Comme pp65, IE-1 est ciblé par les cellules cytotoxiques CD8+

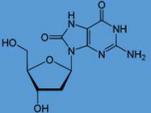
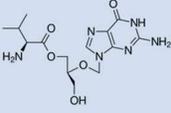
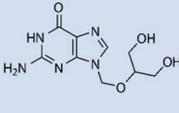
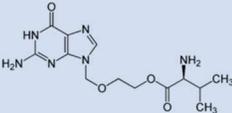
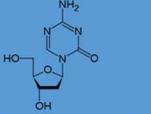
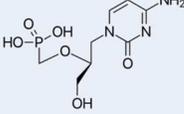
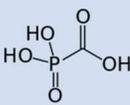
(Mcvoy, 2013). Ce vaccin est bien toléré et il a été démontré que plus de 90% des patients possèdent des anticorps neutralisant dirigés contre ces trois protéines virales après l'administration du vaccin (Reap et al., 2007).

### ***1.7 Antiviraux***

Bien qu'il n'y ait aucun vaccin contre l'infection à HCMV approuvé à ce jour, plusieurs antiviraux sont approuvés et utilisés pour traiter cette infection. Puisque les individus immunocompétents ne présentent généralement aucun symptôme de l'infection et que celle-ci est bien contrôlée par leur système immunitaire, les agents antiviraux sont surtout utilisés chez les patients immunodéficients. Ces antiviraux présentent une toxicité chez l'individu traité ce qui limite grandement leur utilisation de manière prolongée. Un autre inconvénient majeur de ces antiviraux est l'émergence de souches résistantes à leur activité antivirale. Pour contrer ces inconvénients, d'autres antiviraux sont présentement en développement.

#### *1.6.1 Antiviraux approuvés*

À ce jour, six antiviraux sont approuvés et utilisés en clinique (voir tableau 1). La majorité de ceux-ci ont comme cible l'ADN polymérase virale encodée par le gène UL54. C'est donc en affectant la polymérisation du génome viral que ces antiviraux inhibent la réplication virale (voir figure 5). Des études ont été faites pour s'assurer que ces antiviraux ne ciblent pas l'ADN polymérase cellulaire  $\alpha$ , mais bien spécifiquement celle virale qui est aussi de type  $\alpha$  (Li et al., 2010; Mar et al., 1985).

Antiviraux approuvés			
 <b>2'-deoxyguanosine</b>	 <b>Valganciclovir</b>	 <b>Ganciclovir</b>	 <b>Valacyclovir</b>
 <b>2'-deoxycytosine</b>	 <b>Cidofovir</b>		
 <b>Pyrophosphate</b>	 <b>Foscarnet</b>		
<b>Oligonucléotide antisens</b>	<b>5'-GCG TTT GCT CTT CTT CTT GCG-3'</b> <b>Fomivirsen</b>		

**Tableau 1 – Agents antiviraux approuvés et utilisés pour le traitement de l'infection à HCMV.**

Les agents antiviraux et les molécules pour lesquelles ceux-ci sont analogues. Le valganciclovir, le ganciclovir et le valacyclovir sont analogues à la 2'-désoxyguanosine. Le cidofovir est analogue à la 2'-désoxycytosine et le foscarnet est analogue au pyrophosphate. Ces antiviraux ont comme cible commune l'ADN polymérase virale UL54. Contrairement aux autres, le fomivirsen n'est pas un analogue mais plutôt un oligonucléotide antisens de 21 bases complémentaires à la séquence du mRNA de la protéine virale IE-2, une protéine connue pour moduler l'activité de divers promoteurs cellulaires et viraux au cours de l'infection.

#### 1.6.1.1 Ganciclovir

Le ganciclovir (GCV) est le tout premier antiviral développé pour traiter l'infection à HCMV. Il a été initialement approuvé en 1989 par la Food and Drug Administration (FDA) et il est encore utilisé comme traitement de première ligne aujourd'hui (Lurain and Chou, 2010). Étant actif contre plusieurs autres virus, il est aussi utilisé pour le traitement de l'infection à VHS-1, VHS-2, EBV, VHH-6 et VZV (Krause et al., 2014). Ce composé antiviral possède une biodisponibilité orale très faible. Cela fait en sorte que la concentration de l'antiviral est insuffisante pour réduire le titre viral ce qui augmente les chances que les souches exposées à cette concentration sous optimale développent une résistance. Pour que l'antiviral se

retrouve en concentration suffisante, le patient devait ingérer 4 comprimés trois fois par jour (Komatsu et al., 2014). L'antiviral est donc plutôt administré par voie intraveineuse deux fois par semaine pour contrer ces désagréments (Chou et al., 1998).

Le GCV est un analogue nucléosidique de la guanosine. Une fois dans la cellule infectée, ce composé antiviral doit être triphosphorylé (GCV-PPP) pour être sous sa forme active. Le premier groupement phosphate est ajouté par la sérine/thréonine kinase virale UL97 (Biron et al., 1985). Les deux autres groupements phosphates sont ajoutés par des kinases cellulaires. Sous cette forme triphosphorylée, le GCV est désormais un substrat de l'ADN polymérase virale UL54. Le GCV-PPP est un inhibiteur compétitif de cette polymérase en entrant en compétition avec les désoxynucléotides (dNTPs) au niveau de leur site de liaison durant la répllication virale. L'incorporation du GCV-PPP dans l'ADN induit un ralentissement de l'élongation de la polymérase virale. C'est lors de l'incorporation d'un dNTP à la suite du GCV-PPP qu'il y a arrêt complet de la répllication virale (Topalis et al., 2016).

Plusieurs souches virales présentent une résistance à cet antiviral. Cette résistance peut être causée par des mutations dans le gène UL97 qui encode pour la sérine/thréonine kinase. Dans ce cas, la kinase UL97 ne reconnaît plus le GCV comme un substrat. L'ajout du premier groupement phosphate sur le GCV n'aura donc jamais lieu et l'antiviral ne se retrouvera jamais sous sa forme active (Gilbert et al., 2001). La résistance au GCV peut aussi survenir lors de mutations au niveau du gène UL54 encodant pour l'ADN polymérase virale (voir section 2.3).

Le GCV est encore aujourd'hui beaucoup utilisé malgré la présence de diverses souches résistantes puisqu'il est moins toxique comparativement aux autres antiviraux approuvés. L'antiviral se retrouve sous sa forme active seulement dans les cellules infectées par HCMV puisque seules ces cellules possèdent la kinase virale UL97 qui permet l'ajout du premier groupement phosphate. Cela diminue grandement la toxicité de l'antiviral GCV (Komatsu et al., 2014). Toutefois, le GCV possède une toxicité hématologique, soit au niveau de la moelle osseuse et présente donc des impacts particulièrement négatifs chez les patients receveurs de cellules souches hématopoïétiques (Krause et al., 2014).

Puisque le GCV est administré par voie intraveineuse, le patient doit avoir accès à long terme au matériel d'injection. Les risques d'infection, de thrombose et de phlébite à la suite de

l'injection sont donc élevés (Razonable, 2008). Pour faciliter l'usage de cet antiviral, sa prodrogue, le valganciclovir, a été développé.

#### *1.6.1.2 Valganciclovir*

Approuvé en 2001 par la FDA (Kimberlin, 2012), le valganciclovir (VGCV) a été développé pour permettre l'utilisation de l'antiviral GCV par voie orale. Cela permet d'en faciliter l'usage, mais aussi d'éliminer les risques associés à l'administration par voie intraveineuse. Le VGCV administré par voie orale est plus de dix fois mieux absorbé que le GCV administré de la même façon (Komatsu et al., 2014). Le VGCV est une molécule de GCV à laquelle une chaîne L-valyester a été ajoutée (Heinig et al., 2011). Cette chaîne augmente la liposolubilité et permet donc une meilleure absorption intestinale. Le VGCV est rapidement hydrolysé en GCV par les estérases présentes dans le foie ou dans l'intestin (Martin et al., 2002). Cet antiviral, administré par voie orale, présente la même efficacité antivirale que le GCV administré par voie intraveineuse (Åsberg et al., 2007; Togashi et al., 2011). Toutefois, sa toxicité n'est ni inférieure ni supérieure à ce dernier (Åsberg et al., 2007).

#### *1.6.1.3 Cidofovir*

Le cidofovir (CDV) est un antiviral actif contre différents virus à ADN comme les herpèsvirus ou les adénovirus (De Clercq and Holý, 2005). Le CDV a été initialement approuvé en 1996 pour le traitement de l'infection à HCMV (Lurain and Chou, 2010). Comparativement aux autres antiviraux actuellement utilisés, il possède une demi-vie plus longue ce qui diminue la quantité injectée et aussi le nombre d'injections. Par contre, son utilisation clinique est limitée par le fait qu'il est souvent associé à une néphrotoxicité et à une neutropénie (Biron, 2006). Aussi, des études portées sur des animaux ont montré que cet antiviral est cancérigène, tératogène et qu'il cause une hypospermie (Komatsu et al., 2014). À cause de ces effets néfastes, le CDV est utilisé en seconde ligne chez les patients ayant une maladie associée à HCMV d'établie et dont les traitements avec le GCV/VGCV et/ou le foscarnet n'ont pas fonctionné.

Le CDV est un analogue nucléotidique acyclique de la cytosine monophosphaté. Possédant déjà un groupement phosphate, le CDV n'a pas besoin d'être initialement phosphorylé par la

kinase virale UL97. Les deux groupements phosphates manquants, pour acquérir son activité antivirale, sont ajoutés par des kinases de la cellule infectée. La forme active du CDV est donc biphosphatée (CDV-PP) (Cihlar and Chen, 1996). Le mécanisme d'action est similaire à celui du GDV-PPP (voir figure 5). Il est aussi un compétiteur aux dNTPs. Par contre, contrairement au GCV-PPP, il ne provoque pas nécessairement l'arrêt complet de la polymérisation de l'ADN virale par la polymérase UL54. Il engendre un fort ralentissement de l'élongation sauf si deux CDV-PP successifs sont incorporés. Dans ce cas, le CDV-PP devient terminateur de l'élongation (Topalis et al., 2016; Xiong et al., 1997).

Bien que le CDV-PP s'accumule autant dans les cellules saines et infectées dû au fait qu'il n'a pas besoin de l'action de la kinase UL97, il inhibe spécifiquement l'ADN polymérase virale et non celle cellulaire (Magee et al., 2005).

Comme pour le GCV, certaines souches HCMV présentent des résistances au CDV. Ces résistances sont aussi associées à des mutations qui surviennent au niveau du gène viral UL54 (voir section 2.3).

#### *1.6.1.4 Valacyclovir*

Le valacyclovir (VACV) est la prodrogue de l'acyclovir (ACV). Le VACV est une molécule d'ACV sur laquelle il y a eu l'ajout d'une chaîne L-valyester (Biron, 2006). Comme le VGCV, le VACV est hydrolysé en ACV par les estérases hépatiques ou intestinales (Bogner, 2002). Comme le GCV, l'ACV est un analogue nucléosidique de la guanosine (De Clercq and Holý, 2005). Il possède donc le même mécanisme d'action antivirale que le GCV (voir figure 5). L'ACV possède lui aussi une très faible biodisponibilité orale. C'est donc pourquoi sa prodrogue VACV a été développée (Wen and Wang, 2009). Approuvé par la FDA en 2001 (Patil et al., 2010), le VACV est plus efficace pour le traitement d'infection à VHS et VZV que pour le traitement de l'infection à HCMV (Crumpacker et al., 1979). Aussi, une fois dans la cellule infectée, l'ACV sous sa forme active (ACV-PPP) ne s'accumule qu'en très faible quantité puisque l'ACV s'avère à être un mauvais substrat pour la kinase virale UL97 (Talarico et al., 1999). Pour ces raisons, le VACV n'est pas utilisé comme antiviral de première ligne, mais il est surtout utilisé pour le traitement des rétinites chez les patients immunodéficients. Pour ces mêmes raisons, l'ACV n'est plus utilisé en clinique s'il n'est pas sous sa forme de prodrogue. Le fait que l'ACV-PPP s'accumule que très peu dans les cellules

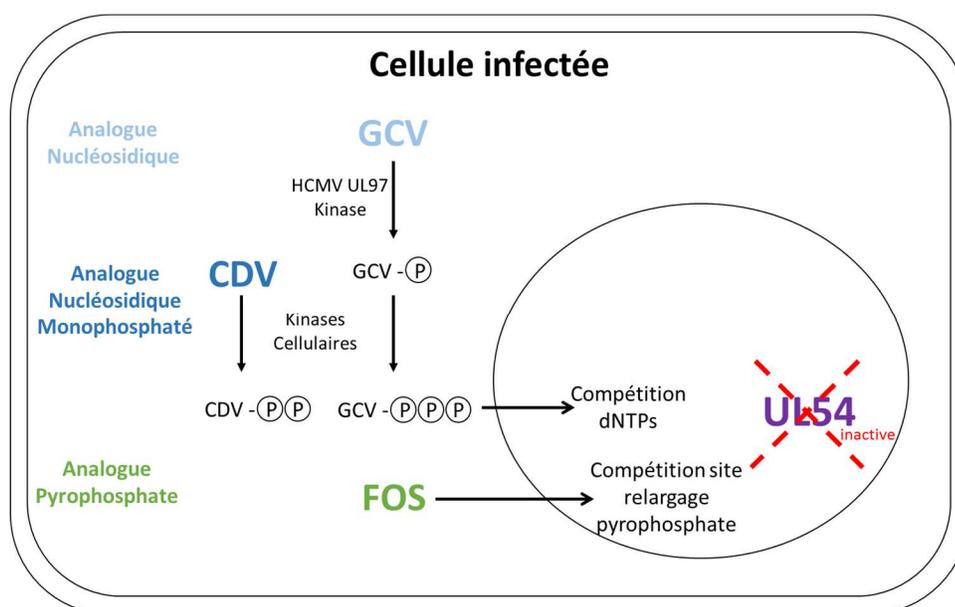
infectées par HCMV provoque la sélection de différentes souches résistantes à l'antiviral puisque ce dernier se retrouve en concentration sous optimale chez le patient (Chou, 1999). Ces souches résistantes présentent généralement des mutations au niveau du gène encodant pour l'ADN polymérase virale (Huang et al., 1999) (voir section 2.3).

#### *1.6.1.5 Foscarnet*

Le foscarnet (FOS), aussi appelé le phosphonoformate (PFA), est un analogue du pyrophosphate approuvé en 1991 par la FDA (Lurain and Chou, 2010). Contrairement aux antiviraux discutés jusqu'à maintenant, le FOS n'a pas besoin d'être activé dans la cellule infectée pour acquérir ses propriétés antivirales (voir figure 5) (Lurain and Chou, 2010). Une fois dans la cellule infectée, l'antiviral se fixe directement au site de relargage du pyrophosphate de l'ADN polymérase virale UL54 (Loregian et al., 2003). Cela empêche le relargage normal du pyrophosphate en figeant les doigts de la polymérase en conformation fermée (Zahn et al., 2011). Le cycle catalytique de la polymérase est donc bloqué. La translocation de l'ADN et l'incorporation du dNTP suivant n'ont pas lieu, ce qui engendre donc l'arrêt de la réplication de l'ADN viral. En effet, le FOS compétitionne avec le phosphate  $\beta$  et  $\gamma$  du dNTP en établissant une interaction avec les résidus polaires du domaine des doigts (Asn, Arg et Lys) et l'Asp du domaine de la paume (Topalis et al., 2016).

N'ayant pas besoin d'être modifié pour exercer son activité antivirale, le FOS s'accumule autant dans les cellules saines qu'infectées. Heureusement, la concentration de FOS utilisée diminue de façon significative seulement l'activité de l'ADN polymérase virale et non celle de l'ADN polymérase cellulaire, aussi de type alpha (Li et al., 2010). Par contre, une certaine toxicité est associée chez ses utilisateurs. Le FOS est associé à des troubles rénaux comme l'insuffisance rénale (Alain et al., 2013), l'hypercréatinémie (Biron, 2006) et l'hypocalcémie (Oberg, 1989). Comme le CDV, il est administré par voie intraveineuse et il est utilisé comme traitement de seconde ligne pour les patients où le GCV n'a eu aucun effet dû à des résistances ou bien pour les patients qui ne peuvent supporter une aussi forte dose de GCV dû à une neutropénie (Komatsu et al., 2014).

Des souches HCMV résistantes au FOS sont aussi présentes et compliquent le traitement de l'infection. Ces résistances sont associées à des mutations ponctuelles dans la séquence peptidique de l'ADN polymérase UL54 (Baldanti et al., 1996) (voir section 2.3).



**Figure 5 - Mécanisme d'action de l'antiviral ganciclovir, cidofovir et foscarnet.**

Le ganciclovir (GCV), un analogue nucléosidique, le cidofovir (CDV), un analogue nucléosidique monophosphaté, et le foscarnet (FOS), analogue au pyrophosphate, sont des antiviraux disponibles qui ont tous comme cible l'ADN polymérase virale UL54. Le GCV et le CDV, une fois triphosphorylés, agissent comme inhibiteurs compétitifs au niveau des dNTPs. Le FOS quant à lui compétitionne directement avec le pyrophosphate, soit un sous-produit formé lors de la polymérisation effectuée par l'ADN polymérase UL54. © correspond au groupement phosphate. Adaptée de (Gilbert et al., 2002)

#### 1.6.1.6 Fomivirsén

Le fomivirsén (FOM) est le seul antiviral approuvé et utilisé en clinique ne ciblant pas l'ADN polymérase virale UL54. Cet antiviral est un oligonucléotide antisens de 21 bases complémentaires à la séquence du mRNA de la protéine virale IE-2 (Marshall and Koch, 2009). Cette protéine virale est produite rapidement après l'infection. Elle module l'activité de nombreux promoteurs cellulaires et viraux (Isomura and Stinski, 2013; Stinski and Meier, 2007). Elle est donc importante pour l'infection de HCMV. La diminution de l'expression génique (knock down) d'IE-2, en concert avec IE-1 via l'utilisation de petits ARN interférents (siRNA), provoque l'inhibition de la réplication de HCMV (Hamilton et al., 2014). FOM bloque la traduction de IE-2 et bloque ainsi indirectement le cycle réplcatif du virus (Azad et al., 1993). Il est toutefois proposé que FOM ne cible pas seulement le mRNA

de IE-2 puisqu'une souche de HCMV résistante au FOM a été isolée et ne présentait aucune mutation au niveau du gène UL122, soit le gène encodant pour IE-2 (Mulamba et al., 1998). FOM a été initialement approuvé en 1998 par la FDA pour le traitement des rétinites causées par une infection à HCMV chez les patients sidéens. Toutefois, il n'est plus commercialisé aux États-Unis (Komatsu et al., 2014). Cet antiviral cause une inflammation de la cornée qui est habituellement traitée par l'usage de corticostéroïde (Biron, 2006).

### *1.6.2 Antiviraux en études cliniques*

L'émergence de souches résistantes, les complications d'utilisation associées à la nécessité d'administration intraveineuse (hormis le VGCV) et la toxicité qu'engendrent les antiviraux actuels justifient la nécessité de développer de nouvelles molécules antivirales. Ces antiviraux en devenir devraient avoir une meilleure biodisponibilité orale, une longue durée de vie, des effets secondaires moins importants et un mécanisme d'action différent impliquant une cible différente (autre que l'ADN polymérase UL54) contournant ainsi le problème de résistance actuellement présent.

#### *1.6.2.1 Maribavir*

Le maribavir (MBV) est une molécule antivirale qui cible la kinase virale UL97 (Biron et al., 2002). En inhibant l'activité d'UL97, ce benzimidazole L-ribose (voir tableau 2) perturberait la redistribution de différentes protéines virales du noyau vers le cytoplasme, surtout celles du tégument (Krosky et al., 2003). Le MBV est actif sur les souches HCMV qui présentent des résistances au GCV, CDV et FOS (Drew et al., 2006) ce qui démontre bien que cet antiviral utilise un mécanisme d'action bien différent de ces agents antiviraux actuels.

Par contre, différentes souches résistantes au MBV ont émergé à la suite de leur exposition à l'antiviral (Alain et al., 2013; Drew et al., 2006; Hakki et al., 2011). Cette résistance est associée à des mutations dans le gène UL97, majoritairement différentes de celles conférant une résistance au GCV (Chou et al., 2012a). Quelques mutations ont été rapportées pour provoquer une multi-résistance MBV/GCV (Sahoo et al., 2013). Les résistances à MBV sont aussi associées à l'apparition de mutations dans le gène UL27. Le rôle associé au produit de ce gène n'est pas encore connu. Toutefois, l'apparition de ces mutations pourraient être une

façon pour HCMV de compenser la perte de l'action de la kinase virale UL97 dans les cellules infectées (Chou, 2009). Il a été rapporté que le MBV est un antagoniste du GCV (Chou and Marousek, 2006). Il possède une bonne biodisponibilité orale, soit entre celle du GCV et du VGCV (Trofe et al., 2008). Aussi, il présente une faible toxicité chez les individus traités (Marty and Boeckh, 2011; Swan et al., 2007). Toutefois, une étude clinique en phase III avec cet antiviral n'a pas pu démontrer une efficacité significativement différente du placebo au niveau de la prévention de l'infection et de maladies à HCMV (Marty et al., 2011). Malgré ce résultat, le MBV a été utilisé en France par l'*European Union for a named patient program* chez certains receveurs et, selon leurs résultats, l'antiviral semble plutôt prometteur (Alain et al., 2013). D'autres équipes de recherche semblent obtenir ces mêmes résultats encourageants (Winston et al., 2012; Zegrí Reiriz et al., 2015).

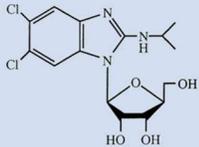
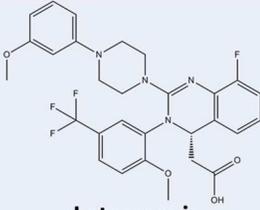
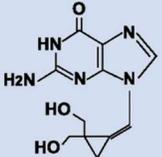
#### 1.6.2.2 Letermovir

Le letermovir (LTV) est un membre d'une toute nouvelle classe d'antiviral non-nucléosidique (voir tableau 2), soit la classe des 3,4 dihydro-quinazolines (Lischka et al., 2010). Cet antiviral possède un mécanisme d'action complètement différent des autres antiviraux. Cette molécule inhibe le complexe de la terminase virale. Elle cible plus spécifiquement le produit du gène UL56 faisant parti de ce complexe terminase (Goldner et al., 2011). Lors de la réplication virale, l'ADN viral est synthétisé de façon continue. Cela crée une longue chaîne d'ADN contenant plusieurs unités répétées du génome viral appelées concatémères. Pour que chaque virion possède sa molécule d'ADN viral, le complexe de la terminase, composé de la protéine UL89 et UL56, effectue le clivage de l'ADN concatémérique en multiple génome unitaire et permet aussi l'emballage au niveau de la nucléocapside (Bogner, 2002). L'antiviral n'inhibe donc pas la synthèse d'ADN viral, mais empêche plutôt la maturation des virions. Le LTV est mille fois plus efficace *in vitro* que le GCV (Bowman et al., 2016) et il est efficace sur les souches présentant des résistances aux antiviraux actuels (Goldner et al., 2011). Il est aussi très spécifique à HCMV (Marschall et al., 2012). Cet antiviral peut être administré autant par voie orale qu'intraveineuse (Bowman et al., 2016). Sans homologue chez le mammifère, la cible de LTV permet de diminuer grandement les risques de toxicité associées à l'utilisation de l'antiviral (Bowman et al., 2016; Lischka et al., 2010; Verghese and Schleiss, 2013). Le LTV est présentement en étude

clinique phase II et tout semble être prometteur (Chemaly et al., 2014). Par contre, des mutations dans le gène UL56 ont été rapportées pour engendrer une résistance au LTV *in vitro* (Goldner et al., 2011) et lors de l'utilisation en essai clinique (Lischka et al., 2016).

### 1.6.2.3 Cyclopropavir

Le cyclopropavir (CPV) est un analogue nucléosidique de type méthylèncyclopropane (voir tableau 2). Il possède un mécanisme d'action complexe impliquant l'inhibition à la fois de la kinase virale UL97 et de l'ADN polymérase virale UL54. En effet, il a la capacité d'inhiber la kinase UL97 (James et al., 2011), mais il peut aussi inhiber l'activité de l'ADN polymérase virale, de façon similaire au GCV, via son activation par cette kinase virale UL97 ou par une GMP kinase cellulaire (Chou et al., 2012b). Le CPV est 5 à 10 fois plus efficace *in vitro* que le GCV (Kern et al., 2005) et il est actif chez les souches isolées présentant des résistances au FOS et au GCV (Wen and Wang, 2009). Administré oralement, le CPV est plus efficace que le GCV chez des souris modèles d'infection à HCMV (Kern et al., 2004). En plus, cette molécule antivirale est présentement en phase I et présente une faible toxicité (Chou et al., 2012b; Chou and Bowlin, 2011). Évidemment, des souches résistantes au CPV ont émergé à la suite d'une exposition à l'antiviral. Ces souches d'HCMV présentent des mutations au niveau du gène UL97 (Chou and Bowlin, 2011; Gentry et al., 2013; Lurain and Chou, 2010), mais aussi au niveau du gène UL54 (Chou et al., 2012b; Hakki and Chou, 2011; James et al., 2011; Lurain and Chou, 2010). Ces mutations peuvent engendrer une résistance unique au CPV ou bien être croisée pour le CPV, GCV et FOS (Hakki and Chou, 2011).

	Antiviraux en études cliniques	Cible (s)
Benzimidazole L-Ribose	 <b>Maribavir</b>	Sérine/thréonine kinase UL97
3,4 Dihydro-Quinazolines	 <b>Letermovir</b>	Protéine UL56 du complexe terminase viral
Méthylèncyclopropane	 <b>Cyclopropavir</b>	Sérine/thréonine kinase UL97 et ADN polymérase UL54

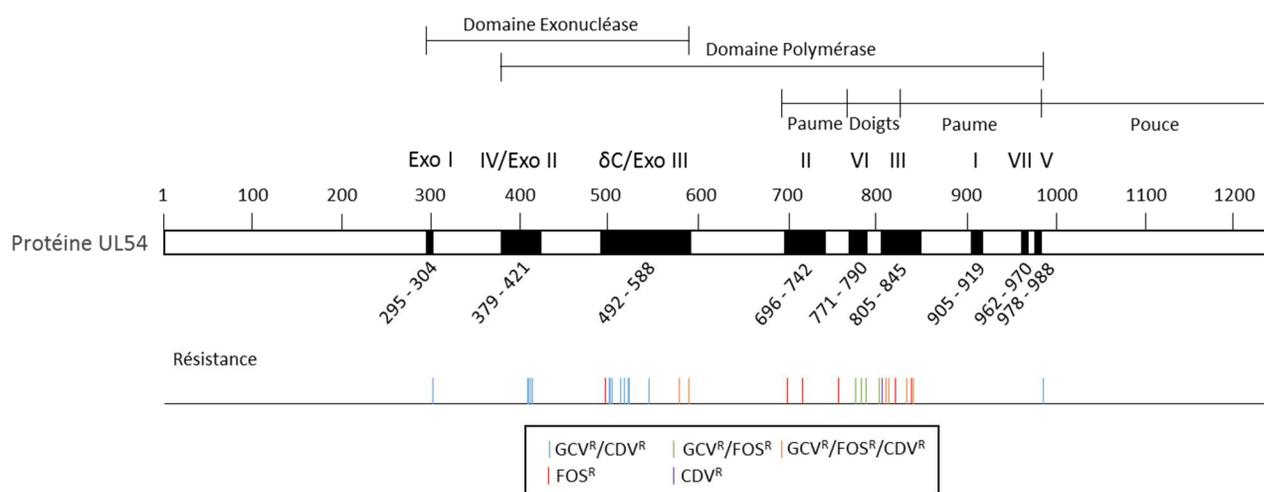
**Tableau 2 – Agents antiviraux en études cliniques.**

Les agents antiviraux présentement en études cliniques, leur classe moléculaire ainsi que leur cible(s) qui leur sont associés. Le maribavir est un membre de la famille des benzimidazoles L-ribose qui inhibe l'activité de la kinase virale UL97. Le letermovir est une molécule chimique non-nucléosidique faisant partie de la classe des 3,4 dihydro-quinazolines. Il cible la protéine virale encodée par le gène UL56 faisant partie du complexe de la terminase virale. Le cyclopropavir est un analogue nucléosidique de type méthylèncyclopropane qui cible à la fois la kinase virale UL97 et l'ADN polymérase virale UL54.

## 2. ADN POLYMÉRASE VIRALE

Généralement, les virus se répliquant au noyau de la cellule hôte produisent moins de protéines virales non structurales que ceux se répliquant au cytoplasme puisqu'ils ont accès à la machinerie de répllication d'ADN et de transcription de l'hôte. Contrairement à ces virus, HCMV produit une ADN polymérase même s'il se réplique au noyau. Cette protéine virale est encodée par le cadre de lecture 54 de la région unique longue, soit le gène UL54. Elle est composée de 1 242 acides aminés lui conférant un poids moléculaire d'environ 140 kilo

Dalton (kDa) (Kouzarides et al., 1987). Elle possède 8 domaines conservés entre les *Herpesviridae* (Lurain and Chou, 2010). Ces régions sont notées de I à VII et  $\delta$ -C (voir figure 6). Cette polymérase virale est exprimée tôt dans le cycle de réplication du virus lors de l'expression des gènes DE (LaFemina and Hayward, 1986). Tandis que son activité 3'-5'exonucléase et polymérase sont bien connues, sa structure est quant à elle loin d'être élucidée. Un modèle d'homologie, fait à partir de l'ADN polymérase de l'*Enterobacteria* phage RB69 (gp43), est toutefois utilisé pour l'étude de l'interaction d'UL54 à ses substrats et aussi pour l'étude du mécanisme moléculaire associé aux résistances antivirales chez HCMV. Étant la cible principale de plusieurs antiviraux, la polymérase UL54 possède des mutations qui sont associées à la résistance à ceux-ci.



**Figure 6 – Schéma de l'ADN polymérase virale UL54 et les différentes mutations ponctuelles conférant à HCMV une résistance antivirale.**

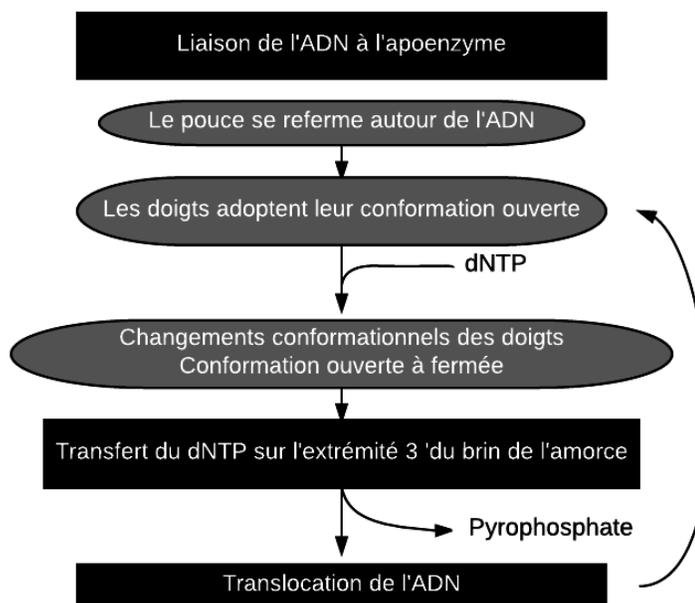
La portion supérieure de la figure représente les différents domaines catalytiques de la protéine (exonucléase et polymérase). Les différents domaines de la polymérase (paume, doigts et pouce) sont aussi représentés dans cette portion. Les boîtes noires représentent les régions conservées entre les *Herpesviridae* (ExoI, IV/ExoII,  $\delta$ C/ExoIII, II, VI, III, I, VII et V). La portion inférieure de la figure montre la carte de mutations (substitutions) associées à la simple ou multi-résistance indiquée par une couleur (résistant au GCV et au CDV en bleu, résistant au GCV et au FOS en vert, résistant au GCV, au FOS et au CDV en orange, résistant au FOS en rouge et résistant au CDV en mauve). Adaptée de (Lurain and Chou, 2010).

## ***2.1 Fonctions et généralités***

L'ADN polymérase UL54 de HCMV possède deux activités catalytiques distinctes. Découverte en 1983, son activité 3'-5'exonucléase lui permet d'avoir un faible taux de mutations (Nishiyama et al., 1983). L'activité de polymérisation de HCMV a été détectée pour la première fois en 1981 (Mar et al., 1981). L'interaction avec sa protéine accessoire, encodée par le gène UL44, permet à la polymérase UL54 d'avoir une excellente processivité. Cela lui permet de répliquer l'énorme génome de 235 kpb et ce de façon continue pour former l'ADN concatémérique.

L'ADN polymérase UL54 est une polymérase de type  $\alpha$ . Les polymérases de ce type ont été regroupées ensemble par le fait qu'elles ont toutes une structure semblable à une main droite initialement décrite en 1985 (Ollis et al., 1985). En effet, ces ADN polymérases possèdent des domaines en forme de paume, de pouce et de doigts. La paume est le site catalytique de la polymérase tandis que le pouce et les doigts permettent la fixation du duplex d'ADN et du nucléotide entrant, respectivement (Wang et al., 1997). Le domaine des doigts possède deux hélices nommées P et N. Ces hélices contiennent deux acides aminés hautement conservés (Lys-560 dans l'hélice P et Arg-482 dans l'hélice N) entre les ADN polymérases de la famille B qui comprend le type de polymérase  $\alpha$  (Zahn et al., 2011). Ces acides aminés sont connus pour interagir avec la portion triphosphate du nucléotide entrant en effectuant des ponts hydrogènes avec le phosphate  $\alpha$  et  $\beta$  (Franklin et al., 2001).

L'étape initiale de la synthèse de l'ADN implique la liaison du complexe brin matrice et amorce à l'apopolymérase (Kuchta et al., 1987). Le pouce se referme ensuite autour de l'ADN. Un dNTP se lie ensuite à ce complexe binaire, induisant un changement de conformation dans les doigts. Les doigts passent de la conformation ouverte à celle fermée (Li et al., 1998; Pelletier et al., 1994). À ce point, la polymérase possède sa conformation qui la rend catalytiquement compétente. Il y a donc transfère du dNTP à l'extrémité 3'-OH de l'amorce (Li et al., 1998). Une molécule de pyrophosphate est ensuite relâchée permettant ainsi la translocation de l'ADN. Les doigts retrouvent une conformation ouverte, ce qui permet à un autre cycle de recommencer (voir figure 7) (Doublé et al., 1999).



**Figure 7 – Changements de conformation séquentiels de l'ADN polymérase de type  $\alpha$  lors de la polymérisation.**

L'ADN polymérase de type  $\alpha$  interagit d'abord avec le duplex d'ADN composé du brin matrice et de l'amorce. Cette liaison provoque le repliement du pouce sur ce complexe puis le positionnement des doigts en conformation fermée. L'entrée du désoxynucléotide (dNTP) dans la poche catalytique engendre le changement de conformation des doigts à celle fermée. C'est alors que le dNTP est transféré en 3'-OH de l'amorce. Il y a libération du pyrophosphate ce qui permet la translocation de l'ADN et le retour des doigts en conformation ouverte pour l'incorporation du nucléotide suivant. Adaptée de (Franklin et al., 2001).

L'ADN polymérase UL54 possède des problèmes de solubilité lorsqu'elle est exprimée à des fins d'essai *in vitro* (Ducancelle et al., 2005). Dans la littérature, la façon qui est utilisée pour obtenir la protéine complète est en exprimant celle-ci dans des cellules d'insectes infectées par un baculovirus recombinant ou bien en effectuant une transcription/traduction *in vitro*. Toutefois, ces techniques ne permettent pas d'avoir une quantité suffisante de protéines pour étudier sa structure (Tchesnokov et al., 2009). L'expression en baculovirus a été utilisée pour étudier l'interaction d'UL54 avec UL44 (Loregian et al., 2004a, 2004b), avec ICP36 (protéine accessoire à la polymérase) (Ertl and Powell, 1992) et aussi pour étudier l'inhibition de la réplication provoquée par la portion C-terminale de la polymérase UL54 (Loregian et al., 2003). La transcription/traduction *in vitro* est surtout utilisée lors d'études de l'activité enzymatique de la polymérase virale (Tchesnokov et al., 2006). Une quantité faible de la

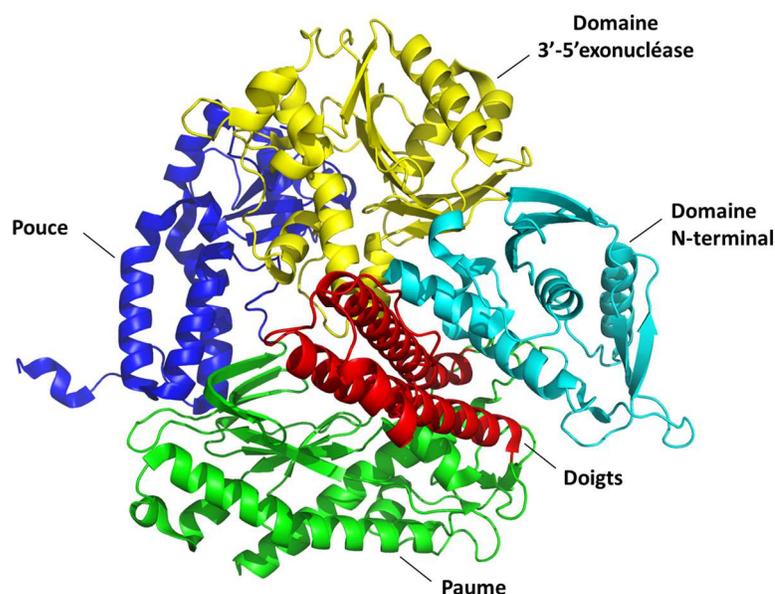
polymérase est suffisante pour détecter son activité enzymatique. L'expression en bactéries de l'ADN polymérase UL54 n'est pas du tout utilisée dans la littérature. Cela peut évidemment se justifier par le fait que sa grande taille rend son expression difficile en bactéries. Elle est reconnue pour s'agréger et se retrouve dans les corps d'inclusion, soient des agrégats protéiques non ordonnés, relativement homogènes et denses (Fink, 1998). Ces corps d'inclusion sont considérés comme des systèmes en équilibre dynamique entre la protéine active et bien repliée et celle inactive et incorrectement repliée (Carrió and Villaverde, 2002). Par contre, l'expression de chimères de gp43 de RB69, comportant des domaines de l'ADN polymérase UL54, est utilisée dans la littérature pour étudier l'implication des différents domaines de la protéine UL54 dans l'interaction de celle-ci avec les différents antiviraux (Tchesnokov et al., 2009; Zahn et al., 2011).

Énormément d'études sur les protéines d'HCMV ont été basées sur ce qui était déjà connue chez les protéines homologues du virus herpès simplex (VHS) dont la polymérase UL54 de HCMV et la polymérase UL30 de VHS-1 (Cihlar et al., 1998a; Ertl and Powell, 1992; Kemble et al., 1987; Loregian et al., 2004a, 2003; Pari and Anders, 1993; Strang and Coen, 2010; Topalis et al., 2016; Wen and Wang, 2009; Zhang et al., 1991). Contrairement à HCMV, la structure cristallographique de l'ADN polymérase UL30 de VHS-1 est disponible (Liu et al., 2006) et est elle aussi utilisée, comme gp43, comme modèle d'homologie pour la structure d'UL54 (Chou et al., 2012b; Tchesnokov et al., 2009; Topalis et al., 2016; Zahn et al., 2011).

## ***2.2 Modèles d'homologie structurale***

Pour contrer à ce manque d'informations qui seraient fournies par une structure cristallographique de la polymérase UL54, un modèle par homologie avec l'ADN polymérase du bactériophage RB69, une polymérase aussi de type  $\alpha$ , a été construit par l'équipe de Sheng-Xiang Lin (Shi et al., 2006). Ce modèle a été créé pour faciliter la compréhension du mécanisme moléculaire de résistance de HCMV aux antiviraux et aussi pour faciliter l'interprétation de nouvelles mutations virales se retrouvant dans le gène encodant pour la polymérase. Le fait que la structure cristallographique de la polymérase UL54 ne soit pas encore élucidée est dû au fait qu'aucune équipe de recherche, à ce jour, n'a

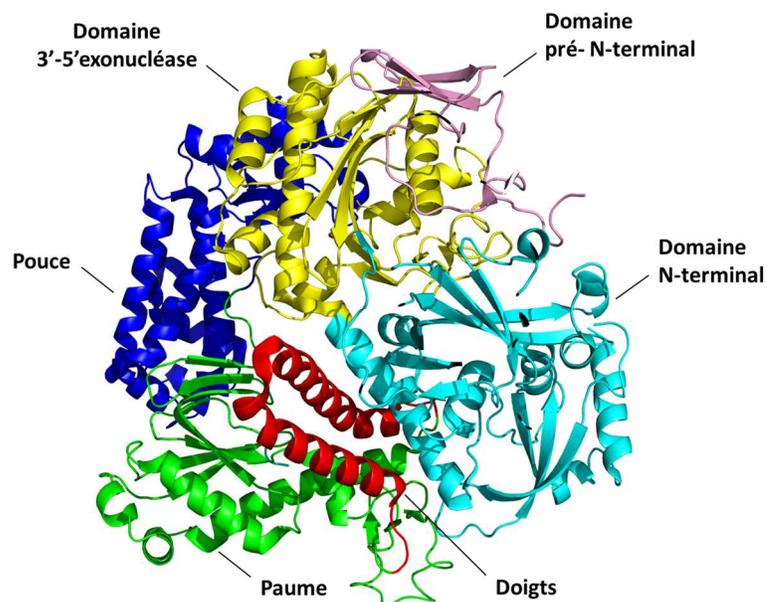
réussi à obtenir cette protéine en assez grande quantité pour procéder à la cristallisation (Tchesnokov et al., 2009). Initialement, le modèle par homologie a été fait à l'aide des structures *Protein Data Bank* (PDB) qui représentent l'ADN polymérase de RB69 en conformation ouverte (1CLQ) et fermée (1Q9Y), respectivement. Une structure cristallographique de l'apoenzyme gp43 de RB69 a été obtenue avec une plus grande résolution (PDB 1IH7, voir figure 8) (Franklin et al., 2001).



**Figure 8 – Modèle d'homologie de l'ADN polymérase virale UL54 fait à partir de l'ADN polymérase du bactériophage RB69 (PDB 1IH7).**

Les différents domaines de la polymérase sont colorés de la façon suivante : N-terminal (cyan), exonucléase (jaune), doigts (rouge), paume (vert) et pouce (bleu). Adaptée de (Shi et al., 2006)

La polymérase UL54 possède 47% de recouvrement et 36% d'identité avec la polymérase gp43 de RB69. L'alignement d'UL54 avec la polymérase UL30 du VHS-1 révèle 83% de recouvrement et 35% d'identité. À cause de ce meilleur pourcentage de recouvrement, la structure cristallographique d'UL30 (PDB 2GV9, voir figure 9) est de plus en plus utilisée comme modèle d'homologie pour l'ADN polymérase UL54 (Chou et al., 2012b; Tchesnokov et al., 2009; Topalis et al., 2016).



**Figure 9 – Modèle d'homologie de l'ADN polymérase virale UL54 fait à partir de l'ADN polymérase du virus Herpès Simplex 1 (PDB 2GV9).**

Les différents domaines de la polymérase sont colorés de la façon suivante : pré-N-terminal (violet), N-terminal (cyan), exonucléase (jaune), doigts (rouge), paume (vert) et pouce (bleu). Adaptée de (Liu et al., 2006)

### ***2.3 Implication dans la résistance antivirale***

Dès la création et l'utilisation relativement prolongée d'antiviraux contre HCMV, des souches présentant des résistances à ces antiviraux ont été identifiées. Ces souches présentent des mutations ponctuelles au niveau du gène UL54 qui encode pour la polymérase virale, soit la cible des antiviraux présentement approuvés et utilisés en clinique. Souvent, ces souches résistantes possèdent aussi des mutations au niveau du gène UL97 ce qui augmente le niveau de résistance (Smith et al., 1997). Seules quelques études rapportent des mutations dans le gène UL54 en absence de mutations dans le gène UL97 (Boivin et al., 2005; Green et al., 2016; Hantz et al., 2010). Aucune mutation, conférant la résistance aux antiviraux, n'a été rapportée dans les régions I et VII du domaine polymérase d'UL54 (voir figure 6). Cela serait dû au fait que ces deux régions sont très importantes pour l'activité de polymérisation (Lurain and Chou, 2010). Une mutation ponctuelle peut conférer autant une simple qu'une multi-résistance. Souvent, les mutations associées à la résistance au GCV provoquent une résistance croisée au CDV. Ces mutations se retrouvent plus fréquemment dans le domaine

exonucléase et dans la région V de la polymérase (Chou et al., 2008, 2003; Cihlar et al., 1998a). Plus rarement, ces mutations provoquant la résistance au GCV confèrent aussi une résistance au FOS. Ces mutations sont retrouvées généralement dans la région VI de la polymérase (Cihlar et al., 1998a; Scott et al., 2007). Il existe des mutations qui confèrent la résistance aux trois antiviraux (GCV, CDV et FOS). Celles-ci se retrouvent dans la région conservée III (Chou et al., 1998; Drew et al., 2006). Les mutations associées à la résistance au FOS uniquement se retrouvent habituellement dans la région II de la polymérase (Cihlar et al., 1998a). Le polymorphisme naturel du gène UL54 survient surtout au niveau des résidus à l'extérieur des régions conservées entre les *Herpesviridae* (Lurain and Chou, 2010). Lors de tests génotypiques, le haut taux de polymorphisme dans le gène UL54 rend encore plus difficile l'association des résistances avec les mutations dans ce gène provoquant la résistance observée (Gilbert et al., 2002).

Jusqu'à maintenant, les mécanismes de résistance aux antiviraux sont très peu connus. Plusieurs études ont démontré que les souches HCMV, possédant des mutations dans le gène UL54 associées à une résistance, présentent un ralentissement dans la réplication virale en culture cellulaire (Baldanti et al., 1996; Chou et al., 2012b; Cihlar et al., 1998b). La présence d'infections de patients avec des souches HCMV résistantes à tous les antiviraux présentement approuvés et utilisées justifie l'importance de mieux caractériser les mécanismes associés aux résistances de ces antiviraux et aussi de mieux comprendre le rôle des mutations conférant les résistances. Les mutations ponctuelles Q578H, D588N, V812L, T813S, A834P, G841A et la délétion 981-982 confèrent la résistance à tous ces antiviraux approuvés (Hakki and Chou, 2011; Sahoo et al., 2013; Topalis et al., 2016). L'infection de patients immunosupprimés avec ces souches résistantes ont conduit, pour la plupart, à la mort du patient (Blackman et al., 2004).

## **HYPOTHÈSE ET OBJECTIF DE RECHERCHE**

### **Hypothèse**

Étant tous des molécules entrant en compétition avec des substrats utilisés par la polymérase ou étant un produit généré par celle-ci, les antiviraux actuellement approuvés et utilisés doivent interagir avec la polymérase virale UL54 pour être actifs. Les mutations, retrouvées chez les souches résistantes aux antiviraux, affecteraient donc la liaison des antiviraux à la polymérase virale les rendant ainsi inefficaces contre le virus. Ces mutations pourraient aussi provoquer des changements conformationnels de la polymérase qui interféreraient avec cette interaction antiviral/polymérase.

### **Objectif principal**

Étudier la liaison des différents antiviraux à la polymérase virale UL54 de type sauvage et aux diverses formes mutées d'UL54 associées à la résistance antivirale.

### ***Sous-Objectifs***

- Produire les différentes formes de la polymérase virale UL54 de type sauvage et mutante de façon recombinante et pure par expression en bactéries.
- Étudier la structure des différentes protéines recombinantes par spectropolarimétrie de dichroïsme circulaire.
- Étudier l'affinité des différentes formes de la protéine UL54 pour différents antiviraux par microcalorimétrie.

## MATÉRIEL ET MÉTHODES

### Protéines recombinantes

#### *Génération des différents clones (clonage moléculaire)*

La séquence codante pour l'ADN polymérase virale UL54 utilisée le plus couramment dans la littérature est celle de la souche AD169 de HCMV (Baldanti et al., 1996; Boivin et al., 2005; Cihlar et al., 1998a; Loregian et al., 2004b). La portion contenant les acides aminés de 293 à 953 de cette séquence de référence d'AD169 a été clonée dans le vecteur d'expression pET28a contenant le promoteur de la T7 ARN polymérase. La polymérase UL54(293-953) a été clonée de sorte qu'elle soit fusionnée en C-terminal à une étiquette de 6 histidines (6xHis).

#### *Mutagenèse dirigée*

Les différents mutants associés à la résistance aux antiviraux ont été générés en effectuant les mutations ponctuelles appropriées au niveau de la séquence codant UL54(293-953) clonée dans pET28a. Pour ce faire, la méthode de type QuikChange d'Agilent a été utilisée. Une paire d'amorce complémentaire, d'une longueur d'environ 35 nucléotides possédant la mutation désirée au centre, a été conçue et commandée chez *Integrated DNA Technologies*. Ces amorces utilisées à une concentration finale de 0.5µM chacune en présence de 25ng de UL54(293-953)pET28a de type sauvage (WT), de 0.5mM dNTP (dATP (Sigma-Aldrich, D4788), dTTP (Sigma-Aldrich, T9656), dCTP (Sigma-Aldrich, D4913) et dGTP (Sigma-Aldrich, D5038)), de 1.5X de tampon de réaction de la PfuUltra AD, de 5% final de DMSO et 2.5 unités (U) de la polymérase haute fidélité Pfu AD (Agilent, 600385) ont permis d'effectuer la réaction de polymérisation en chaîne (PCR). Les PCR, qui ont permis d'obtenir les différents plasmides mutés, ont été réalisées en utilisant un programme possédant les étapes suivantes : dénaturation initiale de 2 min à 94°C, 20 cycles des 3 étapes de bases de la PCR (dénaturation 50 secondes (sec) à 94°C, hybridation 50 sec à 60°C et élongation 8 minutes (min) à 72°C) et élongation finale de 10 min à 72°C. Le plasmide WT a été ensuite dégradé via l'ajout de 20U de DpnI (NEB, R0176S) au produit PCR. À partir du 25µL total du produit PCR, 20µL ont été migrés sur gel d'agarose 1%, 1X *Red Safe* pour confirmer la

réussite de la PCR et 5µL ont été utilisés pour effectuer la transformation de UL54(293-953)pET28a muté dans des *Escherichia coli* (*E. coli*) DH5α<sup>TM</sup>. Ensuite, les réactions de transformation ont été étalées sur Pétri *Lysogeny Broth* (LB) agar supplémenté avec 30µg/mL de kanamycine. Ces Pétri ont été incubés toute la nuit (O/N) à 37°C. Parmi les colonies sélectionnées et obtenues sur les Pétri, quelques-unes ont été inoculées dans 5mL de LB supplémenté avec 30µg/mL de kanamycine qui ont été ensuite incubés O/N à 37°C sous agitation de 220rpm. L'ADN plasmidique de ces différents clones d'UL54 muté a été extrait et purifié des bactéries à l'aide d'une trousse commerciale miniprep (Sigma-Aldrich, PLN350). L'ADN plasmidique purifié a été séquencé par la plate-forme de l'Université Laval à Québec pour confirmer que les mutations désirées étaient bel et bien obtenues sans l'apparition de mutations non désirées.

### ***Expression des protéines recombinantes***

L'ADN plasmidique correspondant aux différents clones de UL54(293-953)pET28a WT ou muté a été transformé dans des *E. coli* BL21(DE3). Une pré-culture bactérienne de 5mL de chacun des clones, ayant crû O/N, a été inoculée dans 1L de LB supplémenté avec 30µg/mL de kanamycine. Ces litres de BL21(DE3)/UL54(293-953)pET28a ont été incubés à 37°C jusqu'à ce que la densité optique (DO) à 600nm de la culture soit d'environ 0.5 (environ 3 heures). L'expression des différentes protéines recombinantes a ensuite été induite via l'ajout de 0.4mM d'IPTG (Bioshop, IPT001). De l'éthanol a été aussi ajouté pour obtenir une concentration finale de 2% stimulant ainsi la production de chaperonnes bactériennes. Les litres de culture sont remis à 37°C durant 3 heures. Suite à l'expression, les bactéries sont culotées. Pour ce faire, les cultures ont été centrifugées 10 min à 5 000rpm dans un rotor *Sorvall* SLA-1500. Ces culots sont conservés à -80°C jusqu'à l'étape de purification.

### ***Purification des protéines recombinantes***

Il est à noter que les manipulations qui suivent ont toutes été faites à 4°C ou minimalement sur glace. Les culots de bactéries précédemment induites ont été dégelés et resuspendus dans 30mL du tampon A (50mM Tris-HCl pH7.5). Les bactéries ont été lysées par l'ajout de 100µg/mL de lysozyme (Bioshop, LYS702), 0.1% triton X-100 et 1µg/mL de DNase I

(Sigma, DN25). Les resuspensions bactériennes ont ensuite été incubées 30 min à température pièce (TP) avec faible agitation. Les lysats ont été soniqués à 20% d'amplitude durant 2 min au total en alternance de 5 sec de sonication et de 5 sec de pause. La fraction insoluble est finalement recueillie par centrifugation des lysats durant 45 min à 10 000rpm dans un rotor *Sorvall* SS-34.

Les corps d'inclusion présents dans la fraction insoluble ont été solubilisés comme suit. Le culot correspondant à la fraction non-soluble a été resuspendu dans 5mL de tampon A contenant 2% triton X-100 et centrifugé à 13 300rpm durant 20 min pour retirer les débris et les protéines membranaires. Le nouveau culot a été resuspendu dans 5mL de tampon A contenant 1M NaCl et centrifugé à 13 300rpm durant 20 min pour retirer l'ADN et l'ARN résiduels. Le nouveau culot a été resuspendu avec 5mL de tampon A contenant 8M urée et 20mM  $\beta$ -mercaptoéthanol et centrifugé à 13 300rpm durant 30 min. La fraction soluble contient les corps d'inclusion solubilisés.

La fraction soluble urée a été purifiée à l'aide d'une colonne d'affinité (résine agarose-nickel, GBioscience, 786-407). Pour ce faire, cette fraction a été appliquée sur 5mL de résine de nickel compactée dans une colonne qui a été préalablement équilibrée avec le tampon 1 (50mM Tris-HCl pH7.5, 400mM NaCl, 10% sucrose, 0.1% triton X-100, 25mM imidazole, 8M urée et 20mM  $\beta$ -mercaptoéthanol). Il est à noter que tout au long de la purification tous tampons appliqués sur la colonne s'écoulaient par gravité et que la concentration d'agents dénaturants était compatible avec la résine utilisée. La colonne a été lavée avec 10 volumes de colonne (CV), soit 50mL. Ensuite, la renaturation de la protéine a été faite directement sur la colonne. Un gradient inverse des agents dénaturants a été effectué en faisant passer sur la colonne 2CV de 6 tampons différents. Ces tampons ont les mêmes constituants que le tampon 1 sauf que la concentration en urée et en  $\beta$ - mercaptoéthanol change. Le premier à être utilisé est le tampon 2 ayant 6M urée, ensuite le tampon 3 ayant 4M urée, le tampon 4 ayant 2M urée, le tampon 5 ayant 0M urée, le tampon 6 ayant 0M urée et 10 mM  $\beta$ -mercaptoéthanol et le tampon 7 ayant 0M urée, 0 mM  $\beta$ - mercaptoéthanol et 0% de triton X-100. Finalement, l'élution de la protéine recombinante a été faite par l'ajout de 1CV et de 0.5CV de tampon 8 (50mM Tris-HCl pH8.0, 100mM NaCl, 10% glycérol et 500mM imidazole). Ces éluats ont été ensuite dialysés trois fois dans 1L de tampon C (50mM Tris-HCl pH7.5, 50mM NaCl, 2mM DTT et 10% glycérol) durant 1 heure. Les sacs de dialyse

qui ont été utilisés possédaient une grandeur de pores donnant une limite de 14 kDa (Sigma, D9777). L'efficacité de purification a été vérifiée sur gel SDS-PAGE coloré au bleu de Coomassie. L'identité des protéines recombinantes purifiées a été confirmée par immunobuvardage de type Western en utilisant 0.2µg/mL d'anticorps primaire Penta-His (Qiagen, 34660) et un anticorps secondaire dirigé contre IgG de souris couplé à HRP dilué 1 :5 000 (NEB,7076). Les protéines pures sont conservées au -80°C.

### **Repliement des protéines recombinantes**

Le repliement de chaque protéine recombinante de UL54(293-953)WT C-His<sub>6</sub> ou mutée (1.5µM) a été vérifié via spectroscopie par dichroïsme circulaire (CD) avec le spectropolarimètre Jasco J-810. Chaque échantillon a été analysé dans une cuvette de quartz possédant un parcours optique de 1mm. Les structures secondaires des échantillons ont été analysées en enregistrant le signal d'ellipticité en millidegré (mdeg) dans la région d'UV lointain (190-250nm) en effectuant 5 accumulations à 22°C. Ce signal d'ellipticité a été converti en ellipticité molaire (Mol. Ellip.) à l'aide du logiciel Jasco Spectra Manager™. L'unité des Mol. Ellip. est deg·cm<sup>2</sup>·dmol<sup>-1</sup>. Il est à noter que chaque spectre présenté a été corrigé par la soustraction du spectre obtenu avec le tampon seul.

### **Interaction à l'ADNsb et au dNTP des protéines recombinantes**

Les propriétés intrinsèques d'interaction du domaine catalytique de l'ADN polymérase UL54 ont été vérifiées par spectroscopie à fluorescence. La fluorescence a été mesurée, en triplicata technique et biologique, à l'aide du spectrofluorimètre Hitachi F-2500 à la suite d'une excitation des tryptophanes des protéines recombinantes à 290nm en utilisant une concentration croissante de substrat en présence de 0.6µM d'enzyme dans le tampon de liaison (20mM Tris-HCl pH 7.5, 50mM NaCl et 10 mM MgCl<sub>2</sub>). Chaque spectre obtenu a été corrigé en effectuant la soustraction du spectre obtenu du tampon seul ou en présence du ligand approprié à la concentration donnée. L'ADNsb utilisé dans cette expérience correspond à une séquence comprenant celle du promoteur immédiat-précoce du cytomegalovirus (Picard-Jean et al., 2007). Cet ADNsb utilisé est plus précisément un

oligonucléotide de 30 bases possédant cette séquence : 5'-GAG ATC TGA CGG TTC ACT AAA CGA GCT CCC-3'. Le dNTP utilisé est le dATP.

Pour titrer la quantité de ligand (ADNsb ou dATP) liée à l'enzyme, l'émission de fluorescence a été mesurée à une concentration fixe de protéine et à des concentrations croissantes de ligand. La liaison du ligand à la protéine peut être décrite par l'équation 1,

$$K_d = \frac{[UL54] \cdot [Ligand]}{[UL54 - Ligand]}$$

Où  $K_d$  correspond à la constante de dissociation,  $[UL54]$  correspond à la concentration de la protéine UL54 libre,  $[Ligand]$  correspond à la concentration de ligand non lié et  $[UL54-Ligand]$  correspond à la concentration du complexe de protéine-ligand.

La proportion de ligand lié à la protéine décrite dans l'équation 1 a été déterminée en mesurant l'intensité de l'émission de fluorescence selon l'équation 2,

$$\Delta f / f_o = \frac{[UL54 - Ligand]}{[UL54]_{totale}}$$

Où  $\Delta f$  correspond à la différence de l'intensité de fluorescence émise à une concentration de ligand donnée et de l'intensité de fluorescence émise en absence de ligand,  $f_o$  correspond à l'intensité de fluorescence émise en absence de ligand,  $[UL54-Ligand]$  correspond à la concentration du complexe de protéine-ligand et  $[UL54]_{totale}$  correspond à la concentration de protéine totale.

Dans le cas où la concentration totale de ligand,  $[Ligand]_{totale}$ , est en excès par rapport à la  $[UL54]_{totale}$ , il est assumé que la  $[Ligand]$  est égal à la  $[Ligand]_{totale}$ . L'équation 1 et 2 peuvent être combinées pour donner naissance à l'équation 3,

$$\Delta f / f_o = \frac{[Ligand]_{totale}}{K_d + [Ligand]_{totale}}$$

Les valeurs de  $K_d$  ont été déterminées à partir d'une analyse de régression non linéaire de moindres carrés à l'aide du logiciel GraphPad Prism 7 et des données de titrage obtenues en utilisant l'équation 3.

### **Activité enzymatique des protéines recombinantes**

L'activité enzymatique de la polymérase UL54(293-953) a été étudiée à l'aide de la protéine tronquée obtenue à la suite d'une transcription et d'une traduction *in vitro* ou à la suite d'une expression en bactéries comme décrite précédemment. La transcription a été faite sur le plasmide UL54(293-953)pET28a linéarisé enzymatiquement selon le protocole fourni par la trousse Riboprobe® (Promega, P1440). La traduction dans le lysat de réticulocytes de lapin a été ensuite faite selon le protocole de la trousse (Promega, L4960).

L'essai de polymérisation a été fait en utilisant 7.5µL de lysat où la traduction a eu lieu, 500nM d'UL54(293-953) recombinante ou 1U T4 ADN polymérase (NEB, M0203) (contrôle positif). Le substrat consistait d'une amorce radiomarquée en 5'(5'-TAA TAC GAC TCA CTA TAG GG-3') et d'un brin matrice (5'-TTT TTT TCC GAC CCG CCC TAT AGT GAG TCG TA-3'). Une quantité équimolaire de ces oligonucléotides a été chauffée 5 min à 95°C et refroidie jusqu'à TP pour permettre leur hybridation. Le marquage radioactif de l'amorce a été fait à l'aide d'ATP  $\gamma^{32}\text{P}$  et la T4 PNK (Affymetrix®, 70031) selon les indications de la compagnie. Le mélange réactionnel (15µL) pour l'essai de polymérisation était composé de 25mM Tris-HCl pH8.0, 10mM MgCl<sub>2</sub>, 5mM NaCl, 10pmol dNTPs, 5pmol du complexe d'ADN radiomarqué et de l'ADN polymérase appropriée. Après une incubation de 60 min à 37°C, la réaction a été arrêtée avec 15µL de tampon de chargement (10mM EDTA, 0.025% xylène cyanol FF, 95% formamide). Les produits de réaction ont été analysés sur gel polyacrylamide 10% avec 8M urée et les produits d'ADN radiomarqués ont été localisés par autoradiographie.

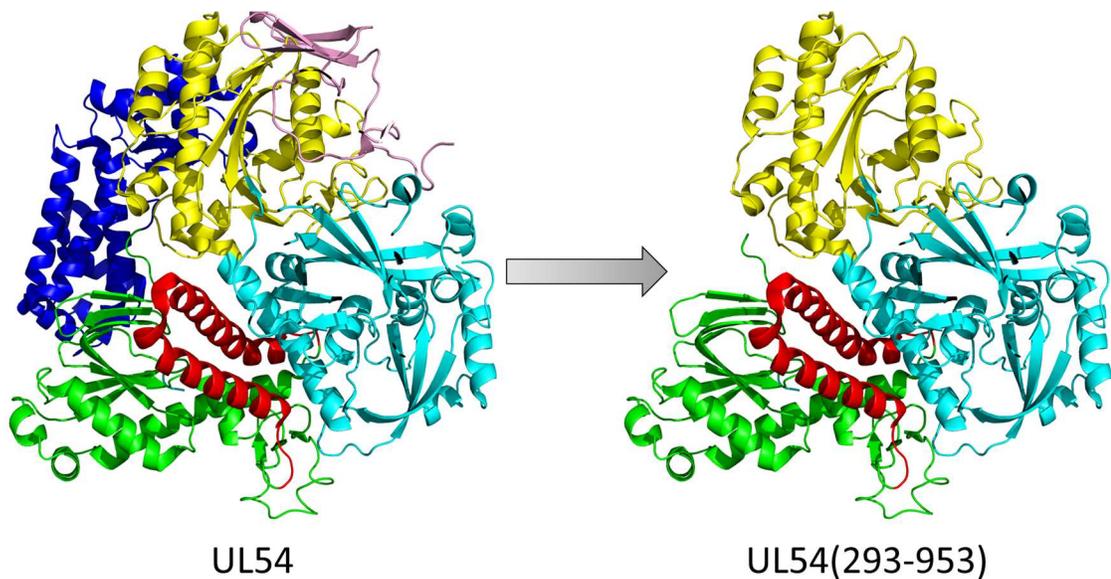
### **Interaction de l'antiviral FOS aux protéines recombinantes**

L'interaction de l'antiviral FOS avec chaque protéine recombinante de UL54(293-953)WT C-His<sub>6</sub> ou mutée a été analysée à l'aide du MicroCal iTC<sub>200</sub> de *General Electric*. Les expériences ont été faites à 25°C avec 750rpm d'agitation. La cellule d'échantillon contenait 200µL de 1.5µM de protéines recombinantes dans le tampon C avec 10mM MgCl<sub>2</sub>. Un total de 17 injections de 100µM de FOS (Sigma-Aldrich, P6801) a été effectué dans la cellule d'échantillon pour une concentration finale de 20µM de FOS. Chaque expérience a été faite en duplicata et analysée par le logiciel Origin™ en assumant le modèle à un seul site de liaison ce qui a permis d'obtenir la constante d'association (K<sub>a</sub>) pour chaque expérience.

## RÉSULTATS

### Production des différentes protéines recombinantes de l'ADN polymérase UL54

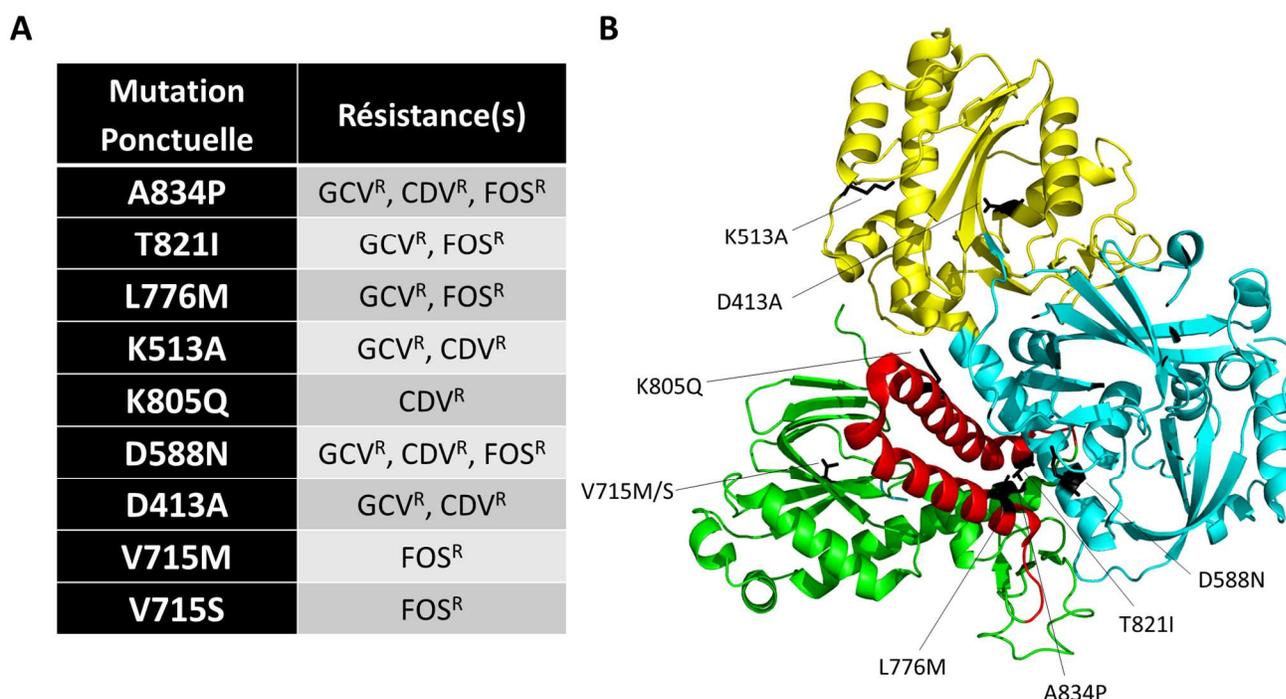
Afin d'étudier l'interaction des différentes formes d'UL54 associées à la résistance aux antiviraux, ces différentes protéines ont été clonées dans le vecteur d'expression pET28a pour permettre leur expression dans les cellules *E. coli* BL21 sous formes de protéines recombinantes étiquetées 6xHis en C-terminal. Puisque la protéine est reconnue pour agréger et avoir des problèmes de solubilité, seule la portion catalytique d'UL54 (acides aminés 293-953) a été clonée (voir figure 10). De cette façon, il a été possible d'obtenir une grande quantité de la polymérase et ce de façon pure.



**Figure 10 – Modèle d'homologie de l'ADN polymérase UL54 complète et tronquée.**

Le modèle a été généré à l'aide du logiciel *Pymol* et du code *Protein Data Bank* (PDB) 2GV9, de l'ADN polymérase UL30 du virus herpès simplex 1 (VHS-1). Les différents domaines de la polymérase sont colorés de la façon suivante : pré-N-terminale (violet), N-terminale (cyan), 3'-5' exonucléase (jaune), doigts (rouge), paume (vert) et pouce (bleu). UL54 correspond à la polymérase complète et UL54(293-953) correspond à la polymérase tronquée composée des acides aminés de 293 à 953 de celle complète.

Les différentes mutations ponctuelles associées à la résistance antivirale ont été introduites dans la séquence codante d'UL54 par mutagenèse dirigée de type QuikChange. Les 9 mutations ponctuelles qui ont été ciblées dans ce mémoire sont les acides aminés suivant : A834P, T821I, L776M, K513A, K805Q, D588N, D413A, V715M et V715S (voir figure 11). Il a été possible de cibler ces mutations ponctuelles grâce au laboratoire de Dr Guy Boivin de l'Université de Laval. En effet, ce laboratoire a amassé une collection importante de souches virales qui présentent une résistance aux antiviraux actuellement utilisés. Dans leur laboratoire, le séquençage du génome viral de ces souches a permis d'identifier ces mutations et leur capacité à induire une résistance antivirale a été validée par culture du virus *in cellulo* en présence de l'antiviral associé à la résistance prédite.



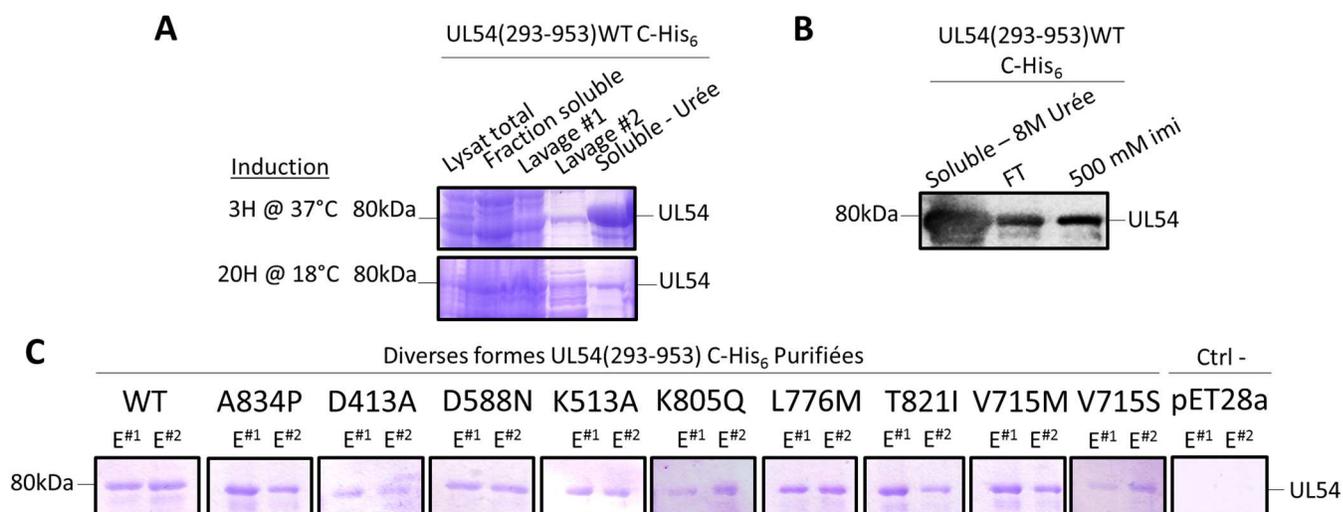
**Figure 11 – Mutations ponctuelles dans le gène codant pour l'ADN polymérase UL54 et leur(s) résistance(s) qui leur sont associées.**

[A] Les mutations ponctuelles peuvent engendrer de simple ou de multi-résistance. La résistance au ganciclovir correspond à GCV<sup>R</sup>, celle au cidofovir à CDV<sup>R</sup> et celle au foscarnet à FOS<sup>R</sup>. Il est à noter que la mutation ponctuelle K805Q confère aussi une hypersensibilité au FOS. [B] Position relative des différentes mutations ponctuelles associées à la résistance antivirale selon le modèle d'homologie effectué à l'aide de la polymérase UL30 de VHS-1 (PDB: 2GV9).

Une fois exprimées et purifiées, ces protéines (type sauvage et mutants) peuvent être utilisées pour mesurer l'interaction entre les différents antiviraux *in vitro*. De plus, les effets de ces mutations sur les activités enzymatiques de la polymérase virale peuvent être étudiés pour caractériser davantage le rôle des résidus mutés dans le mécanisme de résistance antivirale.

### ***Expression et purification des différentes protéines recombinantes***

L'expression de l'ADN polymérase UL54 dans les cellules *E. coli* BL21 a bien fonctionné. Par contre, la protéine recombinante se retrouvait en grande majorité dans la fraction insoluble obtenue après la lyse des cellules bactériennes (voir annexe 2). Les différentes protéines recombinantes produites ont donc été extraites à partir des corps d'inclusion. Deux différentes inductions à l'IPTG des *E. coli* BL21 transformées ont été testées et celle qui était la plus optimale était celle faite à 37°C durant 3 heures (voir figure 12A). Ensuite, la purification de la fraction soluble urée, correspondant aux corps d'inclusion solubilisés, a été purifiée sur colonne d'affinité constituée d'une résine agarose-nickel. Cette purification a permis d'obtenir les différentes protéines recombinantes pures (voir figure 12C). L'identité des bandes obtenues à la suite de l'analyse de la purification sur gel SDS-PAGE a été validé par immunobuvardage de type Western (voir figure 12B). Le contrôle négatif effectué avec des *E. coli* transformées avec pET28a vide a permis de vérifier qu'il n'y avait aucun contaminant protéique bactérien qui se trouvait à la même hauteur sur gel que la protéine d'intérêt.



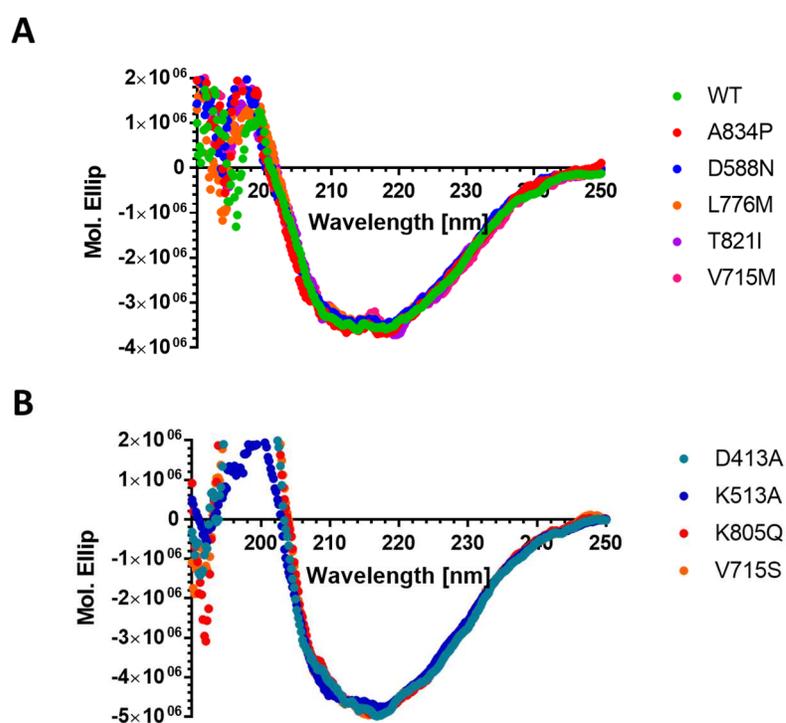
**Figure 12 – Expression et purification des différentes protéines recombinantes de l’ADN polymérase UL54.**

[A] L’extraction de UL54(293-953)WT C-His<sub>6</sub> à partir des corps d’inclusion a été faite sur la fraction insoluble après la lyse des *E. coli* BL21 induites à l’IPTG 3H à 37°C ou 20H à 18°C. Le lavage #1 représente le lavage avec le tampon A + 2% triton X-100 et le lavage #2 représente celui avec le tampon A + 1M NaCl. La fraction soluble – urée correspond à la fraction où les corps d’inclusion sont solubilisés. [B] L’identité de la bande correspondant à UL54(293-953)WT C-His<sub>6</sub> a été confirmée par immunobuvardage de type Western avec l’anticorps primaire Penta-His après 4 secondes d’exposition. La fraction soluble – 8M urée correspond à la fraction où les corps d’inclusion sont solubilisés. Celle FT correspond à la fraction ayant passée au travers la colonne (flow through) durant la purification sur colonne d’affinité. La fraction ‘500mM imi’ correspond à l’élution de la protéine recombinante avec 500mM d’imidazole lors de la purification. [C] Les éluions (#1 = 1CV et #2 = 0.5CV) des différentes protéines recombinantes purifiées sur colonne affinité ont été dialysées et analysées sur gel SDS-PAGE. Le contrôle négatif utilisé est des *E. coli* BL21 possédant pET28a sans l’insert UL54. Celles-ci ont été induites, lysées, purifiées et dialysées comme les autres protéines recombinantes.

### Repliement des différentes protéines recombinantes

Puisque les protéines recombinantes d’UL54 ont été extraites à partir des corps d’inclusion, une renaturation de ces protéines a été effectuée. Cette renaturation a été effectuée directement sur la colonne d’affinité à la suite des différents lavages et juste avant l’élution. Les différentes protéines recombinantes ont été analysées à l’aide de la spectroscopie par dichroïsme circulaire (voir annexe 3). Selon les spectres dichroïques obtenus, ces protéines présentent toutes une forte abondance en structure secondaire composée d’un mélange

d'hélices  $\alpha$  et de feuillets  $\beta$  comme attendu selon le modèle d'homologie (voir figure 10). Toutefois, la déconvolution pour quantifier le pourcentage de ces structures secondaires n'a pas pu être effectuée puisque le voltage du spectropolarimètre (HT[V]) saturait à partir de 200nm. Même après optimisation du tampon, ce phénomène de saturation était toujours présent ce qui rendait le signal de déviation imprécis dans la région de 200 à 190nm. Il est tout de même possible de voir que la renaturation sur la colonne provoque un repliement de la protéine de façon similaire pour toutes les différentes protéines recombinantes indiquant ainsi que l'étape de renaturation est constante (voir figure 13).

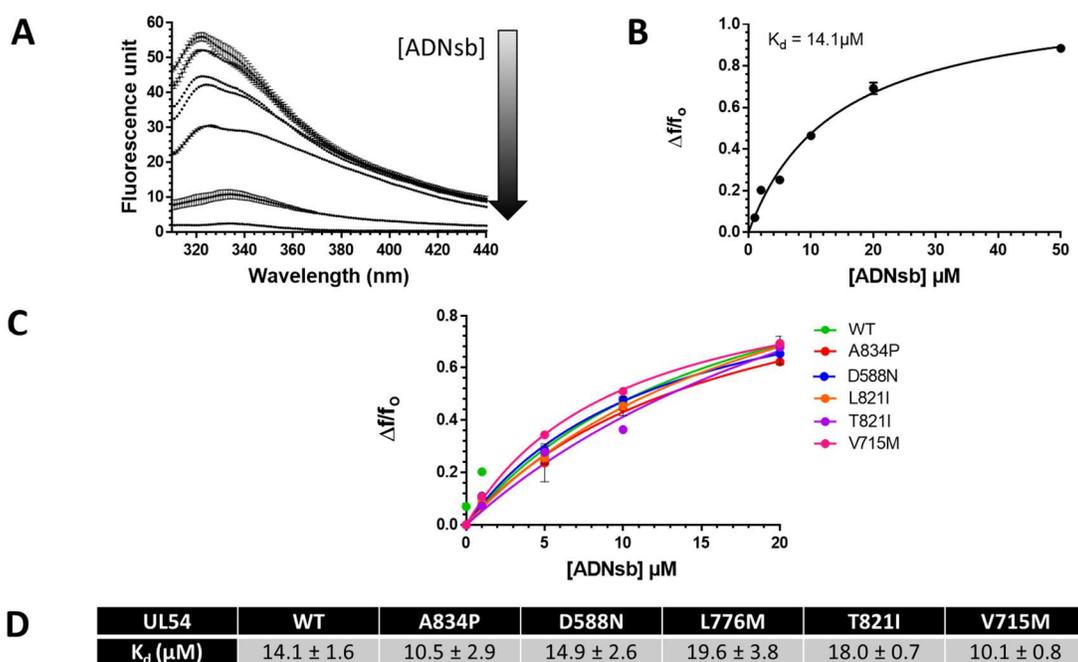


**Figure 13 – Repliement des différentes protéines recombinantes de l'ADN polymérase UL54 analysé par spectropolarimétrie de dichroïsme circulaire.**

Les différents spectres dichroïques présentent l'ellipticité molaire (Mo. Ellip.) en fonction de la longueur d'onde (Wavelength) dans la région UV-lointain (190-250nm). [A] Superposition des spectres dichroïques obtenus avec 1,5 $\mu$ M de UL54(293-953)WT C-His<sub>6</sub>, A834P, D588N, L776M, T821I et V715M. [B] Superposition des spectres dichroïques de UL54(293-953)WT C-His<sub>6</sub> D413A, K513A, K805Q et V715S.

### Interaction des différentes protéines recombinantes à l'ADNsb et au dNTP

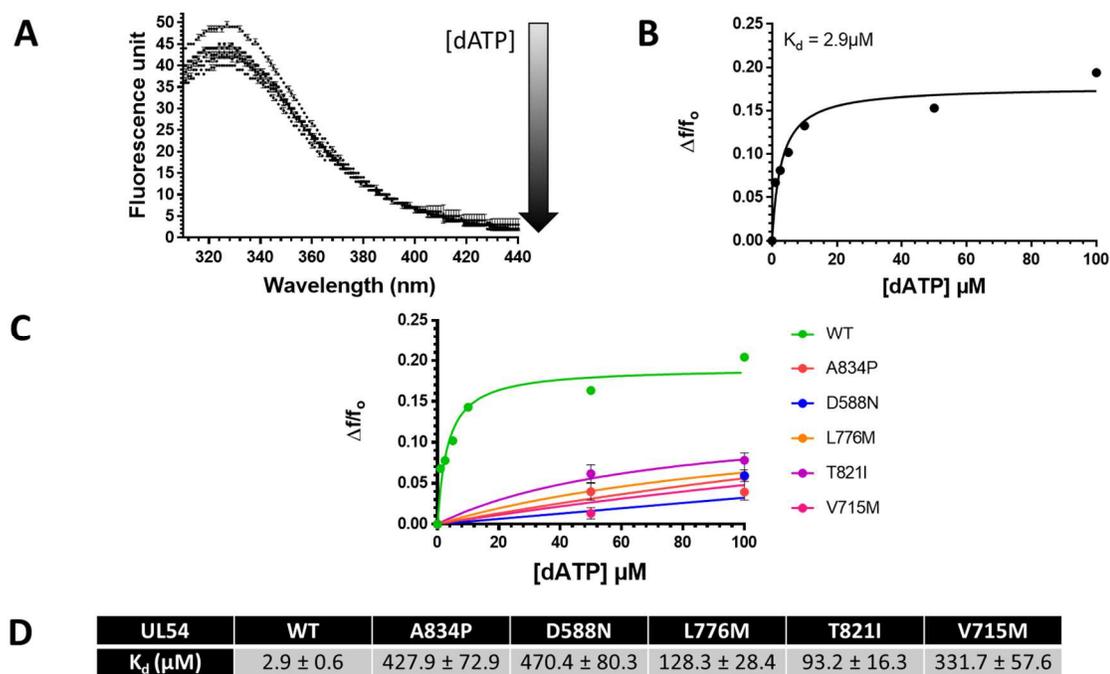
Comme mentionné plus tôt dans ce mémoire, les protéines recombinantes constituent seulement la portion catalytique de l'ADN polymérase UL54. Sa capacité intrinsèque à lier l'ADNsb et les dNTPs a donc été validée par spectroscopie à fluorescence. C'est l'émission de fluorescence du tryptophane présent dans les différentes protéines qui a été utilisée pour suivre l'interaction de la protéine avec son ligand (voir annexe 1). Le dNTP utilisé pour les essais d'interaction est le dATP.



**Figure 14 – Interaction des différentes protéines recombinantes d'ADN polymérase UL54 avec l'ADNsb.**

L'ADN simple brin (ADNsb) utilisé correspond à la séquence comprenant celle du promoteur immédiat-précoce du cytomégalo virus humain. La longueur d'onde d'excitation utilisée a été de 290nm et l'émission de fluorescence a été mesurée de 310 à 440nm. [A] Spectres d'émission de fluorescence en fonction de la concentration de l'ADNsb en présence de 0.6 $\mu\text{M}$  d'UL54(293-953)WT C-His<sub>6</sub> recombinante dans le tampon de liaison. [B] Courbe de liaison de la protéine recombinante UL54(293-953)WT C-His<sub>6</sub> représentée par la différence de fluorescence par rapport à la fluorescence de la protéine en absence de ligand ( $\Delta f/f_0$ ) en fonction de la concentration d'ADNsb en  $\mu\text{M}$ .  $K_d$  correspond à la constante de dissociation. [C] Courbes de liaison des différentes protéines recombinantes UL54(293-953)WT C-His<sub>6</sub> ou mutées. [D] Constante de dissociation des différentes protéines recombinantes en  $\mu\text{M}$ . Les  $K_d$  ont été obtenues à la suite d'une analyse de régression non linéaire de moindres carrés à l'aide du logiciel GraphPad Prism 7 et des données de titrage obtenues en utilisant l'équation 3.

L'interaction de la protéine UL54(293-953)WT C-His<sub>6</sub> avec l'ADNsb ou le dATP provoque une diminution de l'émission de fluorescence du tryptophane présent dans la protéine. Ce phénomène de diminution est de plus en plus important au fur et à mesure que la concentration d'ADNsb ou de dATP augmente (voir figure 14A et 15A). Cela est aussi observé avec les protéines recombinantes d'UL54 possédant une mutation associée à la résistance antivirale. Cette diminution d'émission de fluorescence est provoquée par le changement de l'environnement du tryptophane engendré par l'interaction entre la protéine et le ligand. Il a été vérifié que cette atténuation de fluorescence n'était pas simplement dû à l'ajout du ligand dans le milieu (quenching) (voir annexe 4). Une courbe de liaison pour chaque essai a été faite en utilisant la différence d'émission de fluorescence à concentration de ligand donnée par rapport à l'émission de fluorescence de la protéine en absence de ligand ( $\Delta f/f_0$ ) en fonction de la concentration du ligand. Les courbes de liaison pour la protéine UL54(293-953)WT C-His<sub>6</sub> en présence d'ADNsb et de dATP sont présentées dans la figure 14B et 15B, respectivement. Ces courbes ont été aussi produites pour les protéines mutantes et elles ont été analysées en effectuant une régression non linéaire de moindres carrés avec le logiciel GraphPad Prism 7. Cela a permis de calculer la constante de dissociation ( $K_d$ ) pour chaque protéine recombinante et le ligand d'intérêt (voir figure 14D et 15D). En superposant les différentes courbes de liaison des protéines recombinantes, il est facilement observable que l'affinité de ces protéines est similaire pour l'ADNsb (voir figure 14C). Les  $K_d$  calculées pour chacun sont effectivement similaires (voir figure 14D). Toutefois, lorsque l'on compare les différentes courbes de liaison obtenues pour les protéines recombinantes et le dATP, on observe rapidement que l'affinité des protéines mutantes pour le dATP est plus faible que pour la protéine de type sauvage (voir figure 15C). En effet, la  $K_d$  pour la polymérase UL54(293-953)WT C-His<sub>6</sub> est d'environ 3 $\mu$ M et peut augmenter jusqu'à environ 500 $\mu$ M, par exemple pour la polymérase UL54(293-953)D588N C-His<sub>6</sub> (voir figure 15D).



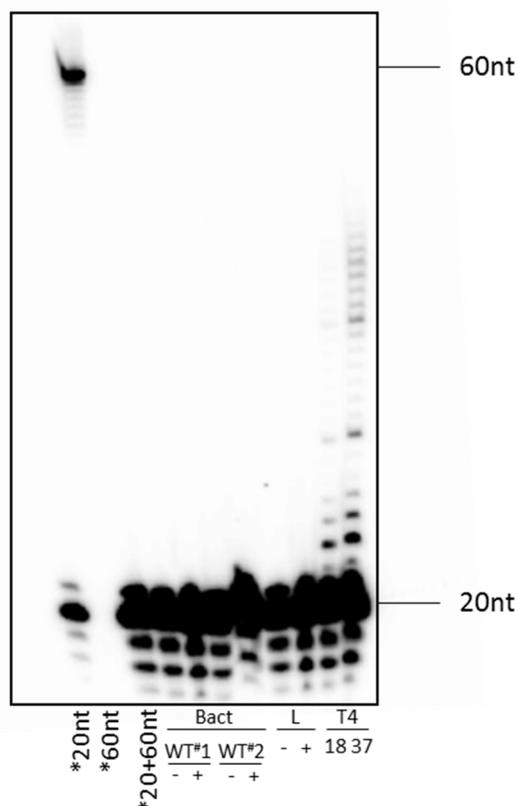
**Figure 15 – Interaction des différentes protéines recombinantes d’ADN polymérase UL54 avec le dATP.**

La longueur d’onde d’excitation utilisée a été de 290nm et l’émission de fluorescence a été mesurée de 310 à 440nm. [A] Spectres d’émission de fluorescence à concentration croissante de dATP en présence de 0.6 $\mu\text{M}$  de UL54(293-953)WT C-His<sub>6</sub> recombinante dans le tampon de liaison. [B] Courbes de liaison de la protéine recombinante UL54(293-953)WT C-His<sub>6</sub> représenté par la différence de fluorescence par rapport à la fluorescence de la protéine en absence de ligand ( $\Delta f/f_0$ ) en fonction de la concentration de dATP en  $\mu\text{M}$ .  $K_d$  correspond à la constante de dissociation. [C] Courbes de liaison des différentes protéines recombinantes UL54(293-953) C-His<sub>6</sub> WT ou mutées. [D] Constante de dissociation des différentes protéines recombinantes en  $\mu\text{M}$ . Les  $K_d$  ont été déterminées à partir d’une analyse de régression non linéaire de moindres carrés à l’aide du logiciel GraphPad Prism 7 et des données de titrage obtenues en utilisant l’équation 3.

#### Activité enzymatique de la protéine recombinante UL54(293-953)WT C-His<sub>6</sub>

Une fois purifiées, dialysées et analysées par spectropolarimétrie et par spectroscopie à fluorescence, les protéines recombinantes pouvaient être utilisées pour étudier l’impact des mutations associées à la résistance antivirale sur l’activité enzymatique de la polymérase UL54. Par contre, l’activité enzymatique de la protéine recombinante de type sauvage devait être validée. Après plusieurs essais, optimisation des constituants du tampon de réaction,

différentes températures de réaction, différentes préparations de protéines recombinantes purifiées de la même façon et même après production de la protéine recombinante par système couplé de transcription/traduction *in vitro*, aucune activité enzymatique de la protéine UL54(293-953)WT C-His<sub>6</sub> n'a été observée (voir figure 16). Le fait que la polymérase utilisée ne possède pas le domaine du pouce pourrait être la cause de cette perte d'activité (voir section 5 – Discussion). Un contrôle positif fait avec la T4 ADN polymérase a été effectué pour s'assurer que l'essai de polymérisation fonctionnait.

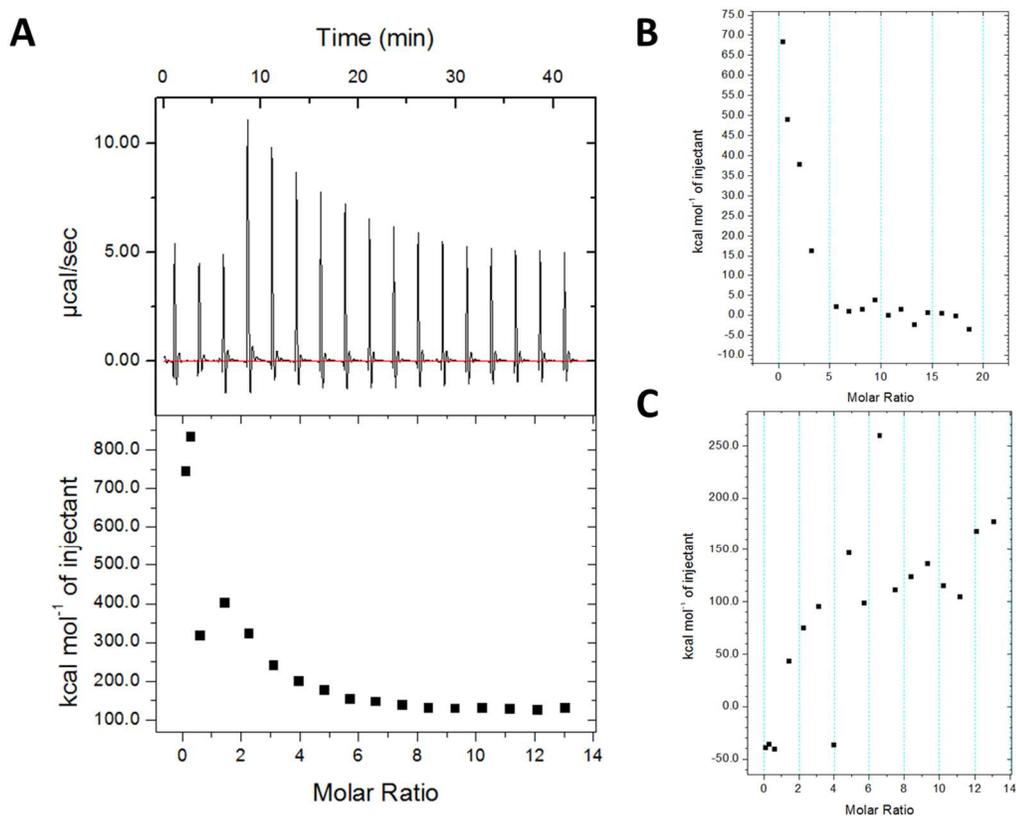


**Figure 16 – Essai de polymérisation avec la protéine recombinante de l'ADN polymérase UL54 tronquée.**

La réaction de polymérisation a été analysée sur un gel polyacrylamide 10% contenant 8M urée et visualisée par autoradiographie. L'amorce de 20nt radiomarquée (\*20nt) et le brin matrice de 60nt radiomarqué (\*60nt) ont été utilisés comme marqueur de taille. Deux différentes purifications de UL54(293-953)WT C-His<sub>6</sub> recombinante (WT#1 et WT#2) provenant de l'expression en bactéries (Bact) ont été utilisées dans cet essai à une concentration de 500nM. L correspond au lysat réticulaire dans lequel UL54(293-953)WT C-His<sub>6</sub> a été exprimé à partir du système couplé transcription/traduction *in vitro*. Un contrôle positif à l'aide de la T4 ADN polymérase a été fait à 18°C (18) et 37°C (37) durant 60 min.

### Interaction des différentes protéines recombinantes à l'antiviral FOS

Une fois qu'il a été démontré que les protéines recombinantes produites avaient conservé leur propriété de liaison intrinsèque avec l'ADNsb et le dATP et qu'elles étaient repliées de façon similaire, ces protéines ont été utilisées pour étudier l'effet des mutations sur l'interaction de l'antiviral foscarnet (FOS) à la polymérase UL54. Pour ce faire, l'interaction du FOS à chaque protéine recombinante a été étudiée par microcalorimétrie.



**Figure 17 – Interaction de l'antiviral foscarnet avec les différentes protéines recombinantes de l'ADN polymérase UL54.**

La solution de foscarnet (FOS) injectée était de  $100\mu\text{M}$ . 17 injections différentes ont été effectuées dans la cellule d'échantillon contenant  $1.5\mu\text{M}$  d'ADN polymérase recombinante UL54 WT ou mutée pour une concentration finale de  $20\mu\text{M}$  de FOS à  $25^\circ\text{C}$ . [A] La portion supérieure montre les données brutes obtenues en microcalorimétrie de la protéine recombinante UL54(293-953)WT C-His<sub>6</sub>. La portion inférieure montre les données de variations d'énergie thermique intégrées en fonction du ratio molaire. Celle-ci est analysée par le logiciel Origin™ en assumant le modèle d'un seul site de liaison donnant la constante d'association ( $K_a$ ) associée. [B] Données de variations d'énergie thermique intégrées en fonction du ratio molaire pour la protéine recombinante UL54(293-953)D588N C-His<sub>6</sub> reconnue pour être FOS sensible. [C] Données de variations d'énergie thermique intégrées en fonction du ratio molaire pour la protéine recombinante UL54(293-953)A834P C-His<sub>6</sub> reconnue pour être FOS résistante.

D'après les résultats obtenus, l'interaction du FOS avec UL54(293-953)WT C-His<sub>6</sub> est endothermique puisque l'appareil doit fournir de l'énergie thermique à la cellule d'échantillon, contenant l'enzyme et son ligand, pour que celle-ci redevienne à la même température que la cellule de référence (voir figure 17A). Le même phénomène est observé lorsque le FOS interagit avec une protéine recombinante possédant une mutation ne lui permettant pas d'être résistant au FOS (voir figure 17B et annexe 5). Étant sensibles au FOS, ces protéines recombinantes interagissent avec cet antiviral.

Par contre, aucune interaction (absorption ou libération d'énergie thermique) n'est détectée lorsque le FOS est mis en présence d'une polymérase UL54 recombinante possédant une mutation ponctuelle qui lui confère la résistance au FOS (voir figure 17C). En effet, les variations d'énergie détectées par le microcalorimètre dans cette situation sont en fait l'effet de dilution provoqué par l'ajout du ligand dans le tampon utilisé dans cet essai (voir annexe 6). Le même type de résultat a été obtenu pour ces protéines en présence de mille fois plus de FOS (20mM final vs 20µM final) (voir annexe 7 et 8). Les protéines recombinantes possédant une mutation ponctuelle reconnue pour conférer une résistance au FOS n'interagissent donc pas avec cet antiviral même à forte concentration de ligand.

Chaque graphique, présentant les données de variation d'énergie thermique intégrées en fonction du ratio molaire pour les différentes protéines recombinantes, a été analysé par le logiciel Origin<sup>TM</sup> en assumant le modèle d'un seul site de liaison. Cela a permis d'obtenir la constante d'association ( $K_a$ ) pour chaque expérience. Les  $K_d$  ont été calculées à partir des  $K_a$  (voir tableau 3). Ces  $K_d$  sont très similaires pour la protéine recombinante de type sauvage (WT) et celles mutantes qui sont associées à la résistance aux antiviraux, hormis le FOS, (D413A et K513A) avec une  $K_d$  d'environ 0,6µM. Cela montre que le FOS a une forte affinité pour ces formes d'UL54. Toutefois, la protéine UL54(293-953)K805Q C-His<sub>6</sub> qui est associée à une hypersensibilité au FOS possède une  $K_d$  de 3.6µM, soit 6 fois plus élevée que pour les protéines recombinantes sensibles au FOS (voir tableau 3). Étant hypersensible au FOS, il aurait été attendu d'obtenir une  $K_d$  plus faible pour ce mutant K805Q. En effet, il aurait été logique que le FOS ait une affinité plus forte pour cette protéine recombinante ce qui aurait justifié l'hypersensibilité. Ce phénomène d'hypersensibilité pourrait être causé par une diminution de l'activité enzymatique de la polymérase et non causé par une meilleure affinité de celle-ci pour l'antiviral (voir section 5 – Discussion).

Mutants	$K_a$ ( $M^{-1}$ )	$K_d$ (nM)	$K_d$ ( $\mu M$ )
WT	$1.97 \times 10^6$ $\pm 8.91 \times 10^5$	508	0.5
D413A	$1.70 \times 10^6$ $\pm 6.43 \times 10^5$	588	0.6
D588N	ND	ND	ND
K513A	$1.73 \times 10^6$ $\pm 1.66 \times 10^6$	578	0.6
V715M	ND	ND	ND
V715S	ND	ND	ND
L776M	ND	ND	ND
K805Q	$2.80 \times 10^5$ $\pm 1.03 \times 10^5$	3571	3.6
T821I	ND	ND	ND
A834P	ND	ND	ND

**Tableau 3 – Constantes d'association et de dissociation de l'interaction de l'antiviral foscarnet avec les différentes protéines recombinantes de l'ADN polymérase UL54.**

Pour chaque essai en microcalorimétrie, les données obtenues ont été analysées par le logiciel Origin™ en assumant le modèle d'un seul site de liaison permettant d'obtenir la constante d'association ( $K_a$ ) en  $M^{-1}$  pour chaque expérience. À partir de ces  $K_a$ , les constantes de dissociation ( $K_d$ ) ont été calculées en assumant que  $K_a = 1/K_d$ . ND correspond à une interaction non-détectée entre le foscarnet et l'enzyme recombinante.

## DISCUSSION

Pour mieux comprendre le mécanisme moléculaire de résistance aux antiviraux utilisés pour le traitement de l'infection à HCMV, il est primordial de comprendre comment ces antiviraux interagissent avec leur cible virale, soit l'ADN polymérase UL54. Grâce au laboratoire du Dr Boivin, différentes mutations ponctuelles de cette polymérase ont pu être associées à la résistance antivirale. La polymérase de type sauvage et les mutants possédant ces mutations ont été produites de façon recombinante pour étudier cette interaction antiviral/polymérase. En effectuant le clonage moléculaire de la portion catalytique seulement, il a été possible d'obtenir en grande quantité d'ADN polymérase UL54 pure (voir figure 12). En effet, la protéine complète est difficile à obtenir en grande quantité dû à ses problèmes de solubilité (Tchesnokov et al., 2009). Il a été possible de montrer que cette protéine tronquée possédait toujours sa capacité intrinsèque d'interaction avec l'ADNsb et les dNTPs (voir figure 14 et 15). La constante de dissociation ( $K_d$ ) obtenue avec la protéine recombinante WT était d'environ 15 $\mu$ M et 3 $\mu$ M pour l'ADNsb et le dATP, respectivement. Ces résultats concordent avec ce qui a été obtenu dans la littérature pour la protéine complète soit d'environ 1 $\mu$ M de  $K_d$  pour ces 2 ligands (Martin et al., 2010; Topalis et al., 2016).

Dans ce mémoire, il a été aussi démontré que l'affinité pour le dATP, des différentes protéines recombinantes possédant une mutation ponctuelle associée à la résistance antivirale, était plus faible par rapport à celle de la protéine recombinante WT. En effet, la  $K_d$  pour la polymérase UL54(293-953)WT C-His<sub>6</sub> est d'environ 3 $\mu$ M et celle pour les polymérases mutantes se situe entre 100 et 500 $\mu$ M (voir figure 15). Dans la littérature, il est bien connu que les souches de HCMV, qui possèdent une mutation leur conférant une résistance antivirale, ont un cycle répliatif ralenti en culture cellulaire (Baldanti et al., 1996; Chou et al., 2007; Cihlar et al., 1998b). Ce phénotype pourrait donc être causé par le fait que ces souches mutantes expriment une ADN polymérase possédant une affinité réduite pour les dNTPs. Les mutations associées à la résistance antivirale affecteraient donc à la fois le site de liaison au dNTP et celui à l'antiviral. Ces mutations pourraient réduire la flexibilité de la polymérase l'empêchant ainsi d'adopter les conformations essentielles à ces interactions.

Selon les essais effectués dans ce mémoire, la polymérase recombinante UL54 n'est pas catalytiquement active (voir figure 16). Lors de la polymérisation, la polymérase effectue plusieurs changements de conformation qui lui sont essentiels. Le domaine du pouce de la polymérase effectue le changement de conformation le plus important durant la polymérisation. En effet, il permet à la polymérase d'adopter sa conformation ouverte et fermée (voir figure 7). La portion clonée de l'ADN polymérase UL54 ne comprend pas ce domaine. Cela pourrait justifier le fait que la polymérase recombinante n'est pas active puisqu'elle ne peut effectuer ce changement conformationnel habituellement provoqué par le pouce. Il serait donc intéressant de cloner la portion catalytique de l'ADN polymérase UL54 en s'assurant que la séquence clonée possède le domaine du pouce et ainsi de voir si cette nouvelle protéine recombinante possède l'activité enzymatique de polymérisation.

Les résultats obtenus par microcalorimétrie, qui sont présentés dans ce mémoire, montrent que le site d'interaction pour l'antiviral foscarnet (FOS) est aboli. Contrairement à la protéine recombinante WT et les protéines mutantes, reconnues pour être sensibles au FOS, aucune interaction n'est détectée par l'appareil pour toutes les protéines recombinantes possédant une mutation ponctuelle reconnue pour conférer la résistance à cet antiviral (voir figure 17). Ces mutations affectent évidemment le site de liaison au FOS de façon locale puisqu'aucune différence de structure secondaire, entre ces protéines recombinantes, n'a été détectée préalablement en spectroscopie par dichroïsme circulaire (voir figure 13). La protéine recombinante WT et celles mutées, étant sensibles au FOS, possèdent la même affinité pour le FOS. En effet, elles possèdent une  $K_d$  d'environ  $0.6\mu\text{M}$ . La mutation K805Q, quant à elle, est reconnue pour conférer une hypersensibilité au FOS (Cihlar et al., 1998a). Contrairement à ce qui était attendu, l'affinité de la protéine recombinante possédant cette mutation est moindre par rapport à celle de la protéine recombinante WT, soit une  $K_d$  de  $3.6\mu\text{M}$ . Cette mutation peut possiblement conférer une hypersensibilité au FOS en rendant la polymérase initialement moins efficace au niveau de la polymérisation de l'ADN viral. Ainsi, une concentration plus faible d'antiviral serait suffisante pour affecter la polymérase même si celle-ci a une affinité plus faible pour le FOS. Il serait donc intéressant de déterminer, via un essai enzymatique, si l'activité de polymérisation de cette polymérase mutée est réduite par rapport à celle de la polymérase de type sauvage.

Dans ce mémoire, les protéines recombinantes mutées, utilisées pour l'essai d'interaction avec le dATP, présentent toutes une résistance à l'antiviral FOS. Il est donc possible de suggérer que le site de liaison du FOS et celui du dNTP sont très rapprochés puisqu'une seule mutation de la polymérase affecte l'interaction avec ces deux molécules simultanément (voir figure 15 et 17). De plus, selon le modèle d'homologie fait avec la polymérase gp43 du bactériophage RB69, le site de liaison pour le dNTP et celui pour le FOS seraient très rapprochés. En effet, la liaison de ces deux molécules à la polymérase impliquerait, entre autres, l'interaction de la lysine 560 (K560) et l'arginine 482 (R482) de l'hélice P, la lysine 486 (K486) de l'hélice N du domaine des doigts et l'acide aspartique 411 (D411) du domaine de la paume (Franklin et al., 2001; Topalis et al., 2016).

Il est à noter que le foscarnet est le seul antiviral qui a été utilisé dans les recherches présentées dans ce mémoire. N'ayant pas besoin d'être modifié dans la cellule infectée pour acquérir ses propriétés antivirales, le foscarnet est disponible commercialement sous sa forme active. Le ganciclovir et le cidofovir quant à eux ont besoin d'être sous forme phosphorylée pour être actifs. Ces molécules, sous forme phosphorylée, ne sont pas commercialement disponibles. C'est pourquoi aucun essai n'a pu être fait jusqu'à présent avec ces antiviraux. Toutefois, le laboratoire du Dr Guy Boivin collabore avec une équipe de chimistes pour effectuer la synthèse de ces formes d'antiviraux phosphorylés.

Le fait que les mutations associées à la résistance antivirale se retrouvent à des endroits dispersés dans la polymérase et que celles-ci peuvent autant engendrer une simple qu'une multi-résistance (voir figure 11) suggère que la résistance antivirale implique plus d'un mécanisme moléculaire. Élucider la structure cristallographique de la protéine et ses différentes formes mutées, en présence de l'antiviral, serait la façon idéale pour mieux comprendre la résistance antivirale de HCMV. Aussi, cela permettrait d'éventuellement élucider les mécanismes moléculaires derrière cette résistance. Finalement, il sera possible de développer des molécules antivirales contournant ces mécanismes de résistance.

### **Comparaison avec une autre ADN polymérase virale $\alpha$ : UL30**

Un des modèles d'homologie, de plus en plus utilisé, pour l'ADN polymérase UL54 est celui fait à partir de l'ADN polymérase UL30 du VHS-1. En effet, lorsqu'alignée à la séquence de la polymérase UL54, cette dernière possède un des meilleurs pourcentages de recouvrement comparativement aux autres polymérases de type alpha. Cette polymérase du VHS-1 est une des polymérases herpétiques les plus étudiées. Plusieurs études effectuées sur les protéines de HCMV ont été basées sur ce qui a déjà été fait chez les protéines homologues du VHS-1. Il serait possible de faire de même pour la polymérase UL54 et UL30.

Pour l'ADN polymérase UL30 de VHS-1, le FOS bloque la polymérisation de l'ADN viral sans toutefois avoir un impact sur l'activité exonucléase. Cela implique que l'effet de l'antiviral sur la réplication du virus affecte directement l'ajout des dNTPs au duplexe amorce/brin matrice en encombrant le site de liaison au pyrophosphate, mais aussi cet antiviral provoque la destruction de l'ADN viral via l'activité exonucléase de la polymérase (Vashishtha and Kuchta, 2016). Cela suggère que l'activité du domaine exonucléase est complètement indépendante de celle du domaine polymérase. Si le FOS agit de la même façon pour l'ADN polymérase de HCMV, les mutations K513A et D413A, se retrouvant dans le domaine exonucléase (voir figure 11), pourraient très bien affecter l'activité exonucléase de la polymérase empêchant ainsi la destruction de l'ADN viral et donc provoquer la résistance. Il serait alors pertinent d'étudier l'effet des mutations associées à la résistance antivirale sur l'activité exonucléase de la polymérase UL54.

Aussi, pour l'ADN polymérase UL30 de VHS-1, la résistance au GCV et au CDV est due à une diminution du taux d'incorporation de ces analogues nucléotidiques dans la chaîne d'ADN lors de la polymérisation (Bestman-Smith and Boivin, 2003). Si le mécanisme de résistance est le même pour la polymérase de HCMV, il sera simple de voir, en microcalorimétrie, une diminution de la  $K_a$  des protéines recombinantes possédant ces mutations associées à cette résistance pour le GCV et le CDV par rapport à la  $K_a$  de la protéine recombinante de type sauvage pour ces mêmes antiviraux.

Toutefois, les études effectuées sur le mécanisme de résistance antivirale chez le VHS-1 ne peuvent pas toutes être utilisées comme modèles chez HCMV puisque ces polymérases présentent évidemment des différences au niveau de leur séquence en acide aminé mais aussi au niveau de mutations équivalentes provoquant des résistances complètement différentes (Piret et al., 2015). Cela suggère que le mécanisme de résistance antivirale pour ces polymérases n'est pas exactement le même.

Une étude effectuée avec la chimère de la polymérase gp43 du bactériophage RB69 a permis d'obtenir la structure cristallographique de ce chimère en présence et en absence de l'antiviral FOS (Zahn et al., 2011). Ces résultats démontraient que la chimère en conformation fermée (voir figure 7) présentait une meilleure conformation pour la liaison stable de l'antiviral. Étant dans cet état non-transloqué, l'ADN polymérase augmenterait donc son affinité pour le FOS. Les mutations associées à la résistance antivirale pourraient empêcher la polymérase d'adopter cette conformation fermée favorable à l'interaction du FOS. En effectuant des analyses dichroïques dans les rayons UV-proche (250-400nm), il serait possible de voir s'il y a des différences dans la structure tertiaire entre les différentes protéines recombinantes de l'ADN polymérase UL54 qui pourraient être associées à l'adoption ou non de cette conformation fermée optimale. Aussi, il serait possible de voir l'existence de cette adoption conformationnelle en effectuant la structure cristallographique des différentes protéines recombinantes d'UL54.

### **Impacts de ma recherche**

Les travaux effectués dans ce mémoire ont démontré qu'il est possible d'exprimer et de purifier une grande quantité de polymérase UL54 recombinante en bactéries. Contrairement aux autres méthodes d'expression habituellement utilisées, ici la quantité de la protéine soluble est assez grande pour procéder à des analyses de structures et d'interactions *in vitro*. La recherche, effectuée durant ma maîtrise, soutient l'hypothèse que le phénomène de réplication ralentie en culture cellulaire chez les souches virales, présentant une résistance antivirale, serait dû à la diminution de l'affinité de la polymérase virale mutée pour les dNTPs.

De plus, cette recherche démontre que l'effet des mutations, conférant une résistance au FOS, sur la polymérase virale UL54 est très localisée puisqu'une seule mutation affecte simultanément la liaison de deux molécules (dATP et FOS) possédant leur poche de liaison très rapprochée (Franklin et al., 2001; Topalis et al., 2016).

D'autres travaux dans ce mémoire sont les premiers à présenter des constantes d'affinité ( $K_a$ ) de la polymérase UL54 pour l'antiviral FOS. Habituellement, on regarde la concentration qui inhibe de moitié la réplication virale *in cellulo* ( $EC_{50}$ ; Effective concentration) ou celle qui réduit de moitié l'activité enzymatique de l'enzyme *in vitro* ( $IC_{50}$ ; Inhibitory concentration). C'est d'ailleurs la première fois qu'une abolition complète de l'interaction de l'antiviral avec les polymérases mutées, reconnues pour conférer un phénotype de résistance, est démontrée.

### **Limitations du projet**

Évidemment, l'une des plus grandes limitations du projet de recherche présenté dans ce mémoire est le fait que la polymérase utilisée soit tronquée. Comme mentionné plus tôt dans la discussion, la polymérase tronquée produite et utilisée dans ce mémoire n'est plus catalytiquement active au niveau de son activité polymérase. Cela est sûrement dû au fait que celle-ci ne possède pas le domaine du pouce lui permettant d'adopter sa conformation ouverte ou fermée. Le fait qu'elle soit tronquée peut apporter évidemment d'autres biais autant au niveau structural qu'au niveau des interactions moléculaires. Une autre limitation de ce projet est que les protéines recombinantes sont exprimées en bactéries. Il y a évidemment absence de modifications post-traductionnelles qui peuvent être essentielles au bon repliement de la protéine, à l'activité enzymatique de celle-ci et à l'interaction avec les ligands d'intérêt. L'expression en bactéries d'une polymérase tronquée n'est donc pas l'idéal, mais celle-ci est la seule façon, jusqu'à présent, qui permet d'obtenir l'ADN polymérase virale UL54 pure en aussi grande quantité.

## Perspectives

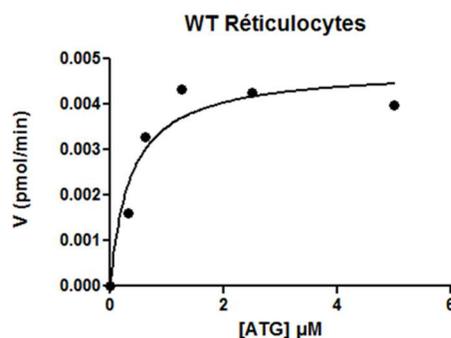
Pour la suite du projet, il serait pertinent d'effectuer le clonage moléculaire de l'ADN polymérase UL54 avec la séquence encodant pour le domaine du pouce. En effet, comme mentionné plus tôt dans ce mémoire, ce domaine permet à la polymérase d'adopter sa conformation ouverte et fermée. Il serait donc pertinent de le retrouver dans les protéines recombinantes produites en bactéries. Toutefois, il faudra s'assurer que l'ajout de ce domaine n'empêche pas l'obtention de la protéine soluble et pure en grande quantité et que les résultats, obtenus avec la forme tronquée produite dans ce mémoire, sont reproductibles.

Aussi, il serait pertinent d'étudier l'activité enzymatique des protéines mutantes pour déterminer l'effet des mutations sur l'activité de polymérisation de l'enzyme virale. À défaut de ne pas être catalytiquement actives, les protéines recombinantes produites dans ce mémoire ne peuvent être utilisées. Toutefois, un essai préliminaire effectué à l'aide de l'ADN polymérase UL54 complète produite via le système couplé transcription/traduction *in vitro* a été fait (voir figure 18). En effectuant cet essai avec les formes mutées de la protéine UL54, il sera possible de vérifier l'effet des antiviraux et des mutations sur les propriétés biochimiques et enzymatiques ( $K_m$ ,  $K_{cat}$ ,  $V_{max}$ , etc.) de cette polymérase. En comparant ces différents paramètres entre la protéine WT et celles mutantes, le mécanisme de résistance antivirale sera mieux compris. Comme mentionné plus tôt dans la discussion, on s'attend à observer une diminution de l'activité enzymatique de l'ADN polymérase UL54 possédant la mutation K805Q ce qui justifierait son hypersensibilité au FOS.

Bien que le repliement des différentes protéines recombinantes, produites dans ce mémoire, possèdent un repliement similaire au niveau de leur structure secondaire (voir figure 13), il se peut que les mutations affectent la structure tertiaire de ces protéines. Il serait donc intéressant d'étudier la structure tertiaire des différentes formes de la polymérase UL54 recombinantes à l'aide de la spectroscopie à dichroïsme circulaire. Pour ce faire, l'échantillon protéique serait analysé dans la région UV-proche (250-400nm). Il serait aussi intéressant de voir si les mutations de la polymérase affectent sa stabilité en effectuant des analyses dichroïques lors d'une dénaturation thermique ou chimique. Si les mutations affectent le repliement ou la stabilité de la protéine et que ces changements sont observables en

spectroscopie par dichroïsme circulaire, il sera possible de mieux comprendre le mécanisme de résistance antivirale.

Évidemment, il serait intéressant d'étudier l'affinité des différentes formes mutées de l'ADN polymérase recombinante UL54 avec les autres dNTPs, non seulement avec le dATP. Cela permettrait de vérifier que l'affinité de la polymérase est aussi diminuée pour ces nucléotides lorsqu'elle possède une mutation associée à une résistance antivirale.



**Figure 18 - Essai préliminaire de l'activité de polymérisation de l'ADN polymérase recombinante complète de type sauvage.**

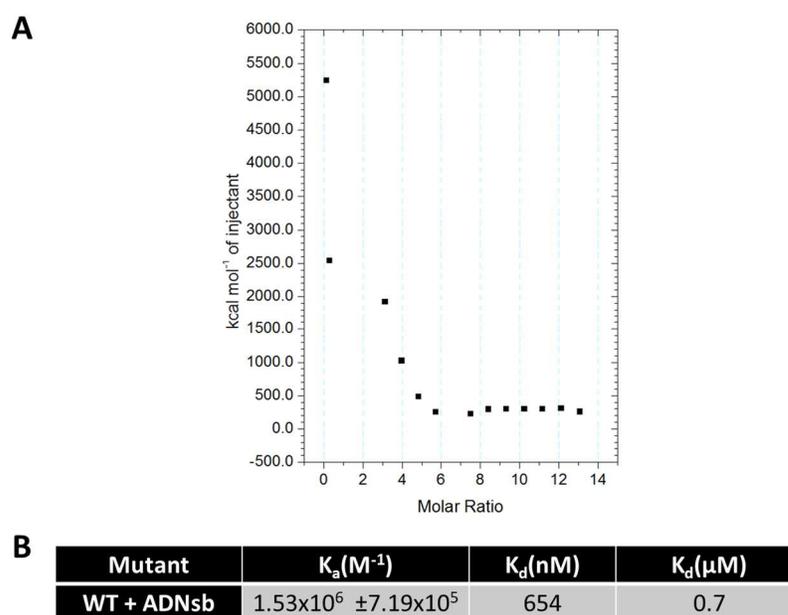
La polymérase de HCMV a été produite à l'aide du système couplé transcription/traduction *in vitro*. La portion traduction a été réalisée dans un lysat de réticulocytes de lapin. L'essai de polymérisation a été effectué à 37°C dans 25mM Tris-HCl pH8.0, 90mM NaCl, 0.5mM dithiothreitol, 0.2mg/mL de BSA, 5% glycérol, 1 $\mu\text{M}$  [ $^3\text{H}$ ]-dCTP, 0.1mg/mL d'ADN activé de thymus de veau et 1 $\mu\text{L}$  de lysat réticulaire où la traduction a eu lieu à des concentrations croissantes de dATP, dGTP et dTTP (0-40 $\mu\text{M}$ ). La vitesse de polymérisation, en pmol de dCTP d'incorporé par minute (pmol/min), est représentée par V et la concentration de dATP, dTTP et dGTP en  $\mu\text{M}$  est représentée par [ATG]. Essai préliminaire fait par Karima Zarouk du laboratoire de Dr Guy Boivin.

Comme mentionné plus tôt dans la discussion, seul l'antiviral FOS est commercialement disponible puisqu'il est déjà sous sa forme active. Lorsque le laboratoire du Dr Boivin et sa collaboration auront réussi à obtenir le ganciclovir et le cidofovir sous leur forme phosphorylée, soit active, l'interaction de ces antiviraux avec les différentes formes de la polymérase UL54 sera étudiée par microcalorimétrie.

Des analyses, faites à l'aide du microcalorimètre, en présence d'ADN ou de dNTPs seraient aussi pertinentes. L'interaction de la polymérase avec les antiviraux, en présence de ces molécules, peut très bien être différente due à l'adoption d'une conformation favorable par exemple. Un essai préliminaire de la protéine recombinante UL54(293-953)WT C-His<sub>6</sub> a été fait en présence de 50µM d'ADNsb (voir figure 19), soit la concentration à laquelle la polymérase est saturée (voir figure 14). La constante d'association ( $K_a$ ) et celle de dissociation ( $K_d$ ) sont très similaires à celles obtenues en absence d'ADNsb (voir tableau 3 et figure 19B). Cela démontre que, pour la protéine recombinante, la liaison au FOS n'est pas dépendante de la liaison à l'ADN. Une fois les protéines recombinantes, possédant le domaine du pouce, produites, il serait intéressant de refaire l'étude d'interaction en microcalorimétrie avec le FOS. Ces analyses pourraient servir à vérifier l'hypothèse que l'antiviral FOS a une plus grande affinité pour la conformation fermée de la polymérase. Pour ce faire, il suffirait de mettre la polymérase recombinante en présence d'ADN et d'un dNTPαS pour qu'elle adopte sa conformation fermée (voir figure 7). En effet, n'étant pas hydrolysable, le dNTPαS permettrait de garder la polymérase sous sa conformation fermée. Ensuite, l'analyse de l'interaction, en microcalorimétrie, de cette polymérase fermée avec le FOS permettra d'observer si la  $K_a$  obtenue est augmentée par rapport à celle de la polymérase tronquée ne possédant pas le domaine du pouce. Si c'est le cas, cela suggéra que le FOS a bel et bien une meilleure affinité pour la polymérase lorsqu'elle est en conformation fermée.

Finalement, il serait pertinent d'étudier l'effet des mutations sur l'activité 3'-5' exonucléase de la polymérase recombinante. Si le FOS agit de la même façon sur UL54 que sur UL30 de VHS-1, il bloquerait la polymérisation de l'ADN viral UL54 sans affecter l'activité exonucléase. Étant encore actif, le domaine exonucléase provoquerait ainsi la destruction de l'ADN viral. Alors si le domaine exonucléase est moins ou n'est plus actif, l'ADN viral ne serait pas dégradé et donc il y aurait résistance des souches possédant ce domaine inefficace. Il serait donc intéressant de voir si les mutations K513A et D413A, se retrouvant dans le domaine exonucléase d'UL54, affectent l'activité 3'-5' exonucléase. Si c'est le cas, cela justifierait le fait que ces mutations provoquent la résistance au FOS via diminution de la dégradation de l'ADN viral par l'activité 3'-5' exonucléase. Pour étudier l'effet des mutations sur l'activité 3'-5' exonucléase de la polymérase recombinante, il suffirait

d'incuber l'enzyme avec un brin d'ADN radiomarqué en absence de dNTPs et d'analyser les différents fragments produits par électrophorèse sur gel polyacrylamide/urée et autoradiographie. Le mécanisme de résistance aux antiviraux pourrait ainsi être séparé en 2 sous-catégories : les mutations affectant l'interaction des antiviraux à la polymérase et celles affectant l'activité exonucléase de cette polymérase empêchant ainsi la destruction de l'ADN viral.



**Figure 19 – Essai préliminaire de l'interaction du FOS avec l'ADN polymérase UL54 recombinante de type sauvage en présence d'ADNs<sub>b</sub>.**

Cet essai a été fait à l'aide du MicroCal iTC<sub>200</sub> de *General Electric* à 25°C avec 750rpm d'agitation. La cellule d'échantillon contenait 200 $\mu$ L de 1.5 $\mu$ M de la polymérase UL54(293-953)WT C-His<sub>6</sub> et 50 $\mu$ M d'ADNs<sub>b</sub> dans le tampon C avec 10mM MgCl<sub>2</sub>. Un total de 17 injections de 100 $\mu$ M de FOS (Sigma-Aldrich, P6801) a été effectué dans la cellule d'échantillon pour une concentration finale de 20 $\mu$ M de FOS. [A] Les données de variations d'énergie thermique intégrées en fonction du ratio molaire qui ont été analysées par le logiciel Origin<sup>TM</sup> en assumant le modèle à un seul site de liaison. [B] La constante d'association ( $K_a$ ) a été calculée à l'aide du logiciel Origin<sup>TM</sup> et la constante de dissociation ( $K_d$ ) a été calculée à l'aide de cette dernière en assumant que  $K_a = 1/K_d$ . L'ADNs<sub>b</sub> utilisé est un oligonucléotide possédant une séquence comprenant celle du promoteur immédiat-précoce du cytomégalo virus humain.

Même après avoir effectué toutes ces perspectives, les mécanismes moléculaires de résistances ne seront pas encore complètement élucidés. Pour bien comprendre l'effet des mutations au niveau de cette résistance, il serait essentiel d'élucider la structure cristallographique de l'ADN polymérase UL54. Cela permettrait d'identifier la position exacte des mutations ainsi que les sites de liaison à l'ADN, au dNTP et aux divers antiviraux. La cristallographie par diffraction des rayons-X des protéines recombinantes produites dans ce mémoire pourraient être effectuées. Cela permettrait de comprendre l'effet des mutations au niveau du repliement et de la structure de la polymérase. Ensuite, il serait possible d'étudier l'interaction des différentes molécules d'intérêt et l'adoption de différentes conformations de la polymérase pour ainsi déterminer les différents mécanismes moléculaires de résistance antivirale.

Une fois que les différents mécanismes de résistance seront élucidés, il sera possible de développer une molécule antivirale qui déjouerait ces différents mécanismes ou bien qui redonnerait, à la polymérase, la sensibilité aux antiviraux présentement utilisés.

## REMERCIEMENTS

Ces dernières années que j'ai passées au laboratoire m'ont permis de m'accomplir autant personnellement que professionnellement. Les personnes exceptionnelles présentes dans ce laboratoire en sont pour une énorme partie. Je veux d'abord remercier mon directeur de recherche, Martin Bisailon, pour m'avoir laissé m'épanouir autant dans un projet de recherche aussi stimulant. J'aimerais le remercier particulièrement de m'avoir assez fait confiance pour me laisser une bonne partie des responsabilités d'assistant de recherche au laboratoire. Cela m'a permis d'enrichir mon bagage professionnel pour l'obtention d'un éventuel emploi. De plus, sa bonne humeur et ses histoires aussi cocasses les unes que les autres ont permis au laboratoire d'avoir cette ambiance si agréable. Je veux aussi remercier mon mentor, Michelle Scott, qui a été là autant pour mes besoins scientifiques que personnels. Je veux également remercier les autres étudiants du laboratoire, Carolin, Simon et Camille pour avoir agrémente nos discussions scientifiques, mais évidemment aussi celles qui traitaient de sujets de tous les jours.

Je remercie aussi Jocelyne Piret, Karima Zarouk et Dr Guy Boivin, pour les discussions et leurs nombreux conseils concernant mon projet de recherche.

Je remercie la faculté de médecine et des sciences de la santé de l'Université de Sherbrooke pour la bourse d'études qui m'a été offerte au début de ma maîtrise. Je remercie aussi le Fond de recherche du Québec - Santé (FRQS) et l'Institut de recherche en santé du Canada (IRSC) pour leur bourse qui m'a été aussi offerte durant ma maîtrise.

Finalement, je remercie grandement ma famille pour m'avoir supportée tout au long de mon parcours universitaire et d'avoir toujours cru qu'« Andréa est capable ».

## LISTE DES RÉFÉRENCES

- Alain, S., Revest, M., Veyer, D., Essig, M., Rerolles, J.P., Rawlinson, W., Mengelle, C., Huynh, A., Kamar, N., Garrigue, I., Kaminski, H., Segard, C., Presne, C., Mazon, M.C., Avettant-Fenoël, V., Lecuit, M., Lortholary, O., Coaquette, A., Hantz, S., Leruez-Ville, M., Ploy, M.C., 2013. Maribavir use in practice for cytomegalovirus infection in french transplantation centers. In: *Transplantation Proceedings*. pp. 1603--1607.
- 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.
- Åsberg, A., Humar, A., Rollag, H., Jardine, A.G., Mouas, H., Pescovitz, M.D., Sgarabotto, D., Tuncer, M., Noronha, I.L., Hartmann, A., 2007. Oral valganciclovir is noninferior to intravenous ganciclovir for the treatment of cytomegalovirus disease in solid organ transplant recipients. *Am. J. Transplant.* 7, 2106–2113.
- Azad, R.F., Driver, V.B., Tanaka, K., Crooke, R.M., Anderson, K.P., 1993. Antiviral activity of a phosphorothioate oligonucleotide complementary to RNA of the human cytomegalovirus major immediate-early region. *Antimicrob. Agents Chemother.* 37, 1945–1954.
- Azevedo, L.S., Pierrotti, L.C., Abdala, E., Costa, S.F., Strabelli, T.M.V., Campos, S.V., Ramos, J.F., Latif, A.Z.A., Litvinov, N., Maluf, N.Z., Caiaffa Filho, H.H., Pannuti, C.S., Lopes, M.H., dos Santos, V.A., Linardi, C. da C.G., Yasuda, M.A.S., Marques, H.H. de S., 2015. Cytomegalovirus infection in transplant recipients. *Clin. (São Paulo, Brazil)* 70, 515–23.
- 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 . *J Virol* 70, 1390–1395.

- Bechtel, J.T., Shenk, T., 2002. Human Cytomegalovirus UL47 Tegument Protein Functions after Entry and before Human Cytomegalovirus UL47 Tegument Protein Functions after Entry and before Immediate-Early Gene Expression. *J. Virol.* 76, 1043–1050.
- 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., 2006. Antiviral drugs for cytomegalovirus diseases. *Antiviral Res.* 71, 154–163.
- Biron, K.K., Harvey, R.J., Chamberlain, S.C., Good, S.S., Iii, A. a S., Davis, M.G., Talarico, C.L., Miller, W.H., Ferris, R., Dornsife, R.E., Stanat, S.C., Drach, J.C., Townsend, L.B., Koszalka, G.W., Al, B.E.T., 2002. Potent and Selective Inhibition of Human Cytomegalovirus Replication by 1263W94 , a Benzimidazole L -Riboside with a Unique Mode of Action. *Antimicrob. Agents Chemother.* 46, 2365–2372.
- 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, 2473–7.
- Blackman, S.C., Lurain, N.S., Witte, D.P., Filipovich, A.H., Groen, P., Schleiss, M.R., 2004. Emergence and Compartmentalization of Fatal Multi-Drug-Resistant Cytomegalovirus Infection in a Patient With Autosomal-Recessive Severe Combined Immune Deficiency 26, 601–605.
- Bogner, E., 2002. Human cytomegalovirus terminase as a target for antiviral chemotherapy. *Rev. Med. Virol.* 12, 115–127.
- 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.
- Boivin, G., Goyette, N., Gilbert, C., Covington, E., 2005. Analysis of Cytomegalovirus DNA Polymerase ( UL54 ) Mutations in Solid Organ Transplant Patients Receiving Valganciclovir or Ganciclovir Prophylaxis. *J. Med. Virol.* 77, 425–429.
- Boppana, S.B., Rivera, L.B., Fowler, K.B., Mach, M., Britt, W.J., 2001. Intrauterine transmission of cytomegalovirus to infants of women with preconceptional immunity. *N. Engl. J. Med.* 344, 1366–71.

- Borst, E.M., Mathys, S., Wagner, M., Muranyi, W., Messerle, M., 2001. Genetic evidence of an essential role for cytomegalovirus small capsid protein in viral growth. *J. Virol.* 75, 1450–1458.
- Boshart, M., Weber, F., John, G., Dorsch-Hasler, K., Fleckenstein, B., Schaffner, W., 1985. A very strong enhancer element is located upstream of an immediate early gene of human cytomegalovirus. *Cell* 41, 5212–5530.
- Bowman, L.J., Melaragno, J.I., Brennan, D.C., 2016. Letermovir for the management of cytomegalovirus infection. *Expert Opin. Investig. Drugs* 1–7.
- Britt, B., 2007. Maturation and Egress. 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 University Press, Cambridge, pp. 311–323.
- Britt, W.J., Mach, M., 1996. Human cytomegalovirus glycoproteins. *Intervirology* 39, 401–412.
- Buerger, I., Reefschlaeger, J., Bender, W., Eckenberg, P., Popp, A., Weber, O., Graeper, S., Klenk, H.D., Ruebsamen-Waigmann, H., Hallenberger, S., 2001. A novel nonnucleoside inhibitor specifically targets cytomegalovirus DNA maturation via the UL89 and UL56 gene products. *J. Virol.* 75, 9077–9086.
- Cannon, M.J., 2009. Congenital cytomegalovirus (CMV) epidemiology and awareness. *J. Clin. Virol.* 46, 6–10.
- Carrió, M.M., Villaverde, A., 2002. Construction and deconstruction of bacterial inclusion bodies. *J. Biotechnol.* 96, 3–12.
- Chemaly, R.F., Ullmann, A.J., Stoelben, S., Richard, M.P., Bornhäuser, M., Groth, C., Einsele, H., Silverman, M., Mullane, K.M., Brown, J., Nowak, H., Kölling, K., Stobernack, H.P., Lischka, P., Zimmermann, H., Rübsamen-Schaeff, H., Champlin, R.E., Ehninger, G., 2014. Letermovir for Cytomegalovirus Prophylaxis in Hematopoietic-Cell Transplantation. *N. Engl. J. Med.* 370, 1781–1789.
- Chou, S., 1999. Antiviral drug resistance in human cytomegalovirus. *Transpl. Infect. Dis.* 1, 105–114.
- Chou, S., 2009. Diverse cytomegalovirus UL27 mutations adapt to loss of viral UL97 kinase activity under maribavir. *Antimicrob. Agents Chemother.* 53, 81–85.

- Chou, S., Bowlin, T.L., 2011. Cytomegalovirus UL97 mutations affecting cyclopropavir and ganciclovir susceptibility. *Antimicrob. Agents Chemother.* 55, 382–384.
- Chou, S., Hakki, M., Villano, S., 2012a. Effects on maribavir susceptibility of cytomegalovirus UL97 kinase ATP binding region mutations detected after drug exposure in vitro and in vivo. *Antiviral Res.* 95, 88–92.
- 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.* 97201, 32–39.
- Chou, S., Marousek, G., Bowlin, T.L., 2012b. Cyclopropavir susceptibility of cytomegalovirus DNA polymerase mutants selected after antiviral drug exposure. *Antimicrob. Agents Chemother.* 56, 197–201.
- 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, 526–30.
- Chou, S., Marousek, G.I., 2006. Maribavir antagonizes the antiviral action of ganciclovir on human cytomegalovirus. *Antimicrob. Agents Chemother.* 50, 3470–3472.
- 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.
- Cihlar, T., Chen, M.S., 1996. Identification of enzymes catalyzing two-step phosphorylation of cidofovir and the effect of cytomegalovirus infection on their activities in host cells. *Mol. Pharmacol.* 50, 1502–1510.
- 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, 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.
- Cristea, I.M., Moorman, N.J., Terhune, S.S., Cuevas, C.D., O’Keefe, E.S., Rout, M.P., Chait, B.T., Shenk, T., 2010. Human cytomegalovirus pUL83 stimulates activity of the viral immediate-early promoter through its interaction with the cellular IFI16 protein. *J. Virol.* 84, 7803–7814.
- Crough, T., Khanna, R., 2009. Immunobiology of human cytomegalovirus: from bench to bedside. *Clin. Microbiol. Rev.* 22, 76–98, Table.
- Crumpacker, C.S., Schnipper, L.E., Zaia, J.A., Levin, M.J., 1979. Growth inhibition by acycloguanosine of herpesviruses isolated from human infections. *Antimicrob. Agents Chemother.* 15, 642–645.
- Cui, X., Meza, B.P., Adler, S.P., McVoy, M.A., 2008. Cytomegalovirus vaccines fail to induce epithelial entry neutralizing antibodies comparable to natural infection. *Vaccine* 26, 5760–5766.
- Das, S., Vasanji, A., Pellett, P.E., 2007. Three-Dimensional Structure of the Human Cytomegalovirus Cytoplasmic Virion Assembly Complex Includes a Reoriented Secretory Apparatus. *J. Virol.* 81, 11861–11869.
- Davison, A.J., Eberle, R., Ehlers, B., Hayward, G.S., McGeoch, D.J., Minson, A.C., Pellett, P.E., Roizman, B., Studdert, M.J., Thiry, E., 2009. The order Herpesvirales. *Arch. Virol.* 154, 171–177.
- De Clercq, E., Holý, A., 2005. Acyclic nucleoside phosphonates: a key class of antiviral drugs. *Nat. Rev. Drug Discov.* 4, 928–940.
- de Graan-Hentzen, Y.C., Gratama, J.W., Mudde, G.C., Verdonck, L.F., Houbiers, J.G., Brand, A., Sebens, F.W., van Loon, A.M., The, T.H., Willemze, R., 1989. Prevention of primary cytomegalovirus infection in patients with hematologic malignancies by intensive white cell depletion of blood products. *Transfusion* 29, 757–760.
- Dioverti, M.V., Razonable, R.R., 2016. Cytomegalovirus. *Microbiol. Spectr.* 4, 1–26.

- Dittmer, A., Drach, J.C., Townsend, L.B., Fischer, A., Bogner, E., 2005. Interaction of the putative human cytomegalovirus portal protein pUL104 with the large terminase subunit pUL56 and its inhibition by benzimidazole-D-ribonucleosides. *J. Virol.* 79, 14660–14667.
- Doublé, S., Sawaya, M.R., Ellenberger, T., 1999. An open and closed case for all polymerases. *Structure* 7, 31–35.
- Drew, W.L., Miner, R.C., Marousek, G.I., Chou, S., 2006. Maribavir sensitivity of cytomegalovirus isolates resistant to ganciclovir, cidofovir or foscarnet. *J. Clin. Virol.* 37, 124–127.
- Ducancelle, A., Gravisse, J., Alain, S., Fillet, A.M., Petit, F., Le Pors, M.J.S., Mazon, M.C., 2005. Phenotypic characterisation of cytomegalovirus DNA polymerase: A method to study cytomegalovirus isolates resistant to foscarnet. *J. Virol. Methods* 125, 145–151.
- Ertl, P.F., Powell, K.L., 1992. Physical and functional interaction of human cytomegalovirus DNA polymerase and its accessory protein (ICP36) expressed in insect cells. *J. Virol.* 66, 4126–4133.
- Fink, A.L., 1998. Protein aggregation: Folding aggregates, inclusion bodies and amyloid. *Fold. Des.* 3, 9–23.
- Fishman, J.A., 2013. Overview: Cytomegalovirus and the herpesviruses in transplantation. *Am. J. Transplant.* 13, 1–8.
- Fowler, K.B., McCollister, F.P., Dahle, A.J., Boppana, S., Britt, W.J., Pass, R.F., 1997. Progressive and fluctuating sensorineural hearing loss in children with asymptomatic congenital cytomegalovirus infection. *J. Pediatr.* 130, 624–630.
- 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.
- Freeman Jr., R.B., 2009. The “indirect” effects of cytomegalovirus infection. *Am J Transpl.* 9, 2453–2458.
- Gentry, B.G., Vollmer, L.E., Hall, E.D., Borysko, K.Z., Zemlicka, J., Kamil, J.P., Drach, J.C., 2013. Resistance of human cytomegalovirus to cyclopropavir maps to a base pair deletion in the open reading frame of UL97. *Antimicrob. Agents Chemother.* 57, 4343–4348.

- Gibson, W., 2008. Structure and formation of the cytomegalovirus virion. *Curr. Top. Microbiol. Immunol.* 325, 187–204.
- Gilbert, C., Bestman-Smith, J., Boivin, G., 2002. Resistance of herpesviruses to antiviral drugs: Clinical impacts and molecular mechanisms. *Drug Resist. Updat.* 5, 88–114.
- Gilbert, C., Roy, J., Belanger, R., Delage, R., Beliveau, C., Demers, C., Boivin, G., 2001. Lack of emergence of cytomegalovirus UL97 mutations conferring ganciclovir (GCV) resistance following preemptive GCV therapy in allogeneic stem cell transplant recipients. *Antimicrob. Agents Chemother.* 45, 3669–3671.
- Gleaves, C.A., Smith, T.F., Shuster, E.A., Pearson, G.R., 1984. Rapid detection of cytomegalovirus in MRC-5 cells inoculated with urine specimens by using low-speed centrifugation and monoclonal antibody to an early antigen. *J. Clin. Microbiol.* 19, 917–919.
- Goldner, T., Hewlett, G., Ettischer, N., Ruebsamen-Schaeff, H., Zimmermann, H., Lischka, P., 2011. The novel anticytomegalovirus compound AIC246 (Letemovir) inhibits human cytomegalovirus replication through a specific antiviral mechanism that involves the viral terminase. *J. Virol.* 85, 10884–10893.
- Goodrum, F., Reeves, M.B., Sinclair, J., High, K., Shenk, T., Dc, W., 2007. Human cytomegalovirus sequences expressed in latently infected individuals promote a latent infection in vitro 110, 937–945.
- Green, C.B., O’Riordan, A., Griffiths, P., Haque, T., 2016. A deletion at CMV UL54 codon 524 without co-existing resistance-associated mutation at UL97 confers resistance to ganciclovir: A case report. *J. Clin. Virol.* 80, 24–26.
- Griffiths, P., Baraniak, I., Reeves, M., 2015. The pathogenesis of human cytomegalovirus. *J. Pathol.* 235, 288–297.
- Griffiths, P.D., Stanton, A., McCarrell, E., Smith, C., Osman, M., Harber, M., Davenport, A., Jones, G., Wheeler, D.C., OBeirne, J., Thorburn, D., Patch, D., Atkinson, C.E., Pichon, S., Sweny, P., Lanzman, M., Woodford, E., Rothwell, E., Old, N., Kinyanjui, R., Haque, T., Atabani, S., Luck, S., Prideaux, S., Milne, R.S., Emery, V.C., Burroughs, A.K., 2011. Cytomegalovirus glycoprotein-B vaccine with MF59 adjuvant in transplant recipients: A phase 2 randomised placebo-controlled trial. *Lancet* 377, 1256–1263.

- Hakki, M., Chou, S., 2011. The biology of cytomegalovirus drug resistance. *Curr. Opin. Infect. Dis.* 24, 605–11.
- Hakki, M., Drummond, C., Houser, B., Marousek, G., Chou, S., 2011. Resistance to maribavir is associated with the exclusion of pUL27 from nucleoli during human cytomegalovirus infection. *Antiviral Res.* 92, 313–318.
- Hamilton, S.T., Milbradt, J., Marschall, M., Rawlinson, W.D., 2014. Human cytomegalovirus replication is strictly inhibited by siRNAs targeting UL54, UL97 or UL122/123 gene transcripts. *PLoS One* 9, 1–12.
- Hantz, S., Garnier-Geoffroy, F., Mazon, M.C., Garrigue, I., Merville, P., Mengelle, C., Rostaing, L., Marcoux, F. Saint, Essig, M., Rerolle, J.P., Cotin, S., Germe, R., Pillet, S., Lebranchu, Y., Turlure, P., Alain, S., 2010. Drug-resistant cytomegalovirus in transplant recipients: A French cohort study. *J. Antimicrob. Chemother.* 65, 2628–2640.
- Heilbronn, R., Jahn, G., Bürkle, A., Freese, U.-K., Fleckenstein, B., Hausen, H., 1987. Genomic Localization, Sequence Analysis, and Transcription of the Putative Human Cytomegalovirus DNA Polymerase Gene. *J. Virol.* 61, 119–124.
- Heinig, K., Wirz, T., Gajate-Perez, A., Belli, S., 2011. Determination of Ganciclovir and its prodrug Valganciclovir by hydrophilic interaction liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *J. Chromatogr. B Anal. Technol. Biomed. Life Sci.* 879, 436–442.
- Ho, M., 2008. The history of cytomegalovirus and its diseases. *Med. Microbiol. Immunol.* 197, 65–73.
- 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.* 96, 447–452.
- Hwang, J.S., Bogner, E., 2002. ATPase activity of the terminase subunit pUL56 of human cytomegalovirus. *J. Biol. Chem.* 277, 6943–6948.
- Isaacson, M.K., Compton, T., 2009. Human Cytomegalovirus Glycoprotein B Is Required for Virus Entry and Cell-to-Cell Spread but Not for Virion Attachment, Assembly, or Egress. *J. Virol.* 83, 3891–3903.

- Isomura, H., Stinski, M.F., 2013. Coordination of late gene transcription of human cytomegalovirus with viral DNA synthesis: recombinant viruses as potential therapeutic vaccine candidates. *Expert Opin. Ther. Targets* 17, 157–166.
- James, S.H., Hartline, C.B., Harden, E.A., Driebe, E.M., Schupp, J.M., Engelthaler, D.M., Keim, P.S., Bowlin, T.L., Kern, E.R., Prichard, M.N., 2011. Cyclopropavir inhibits the normal function of the human cytomegalovirus UL97 kinase. *Antimicrob. Agents Chemother.* 55, 4682–4691.
- Jean Beltran, P.M., Cristea, I.M., 2014. The life cycle and pathogenesis of human cytomegalovirus infection: lessons from proteomics. *Expert Rev. Proteomics* 11, 697–711.
- Jim, W.-T., Shu, C.-H., Chiu, N.-C., Kao, H.-A., Han-Yang, Hung, ;, Jui-Hsing, C., Chun-Chih, P., Wen-Shyang, H., Kuei-Chen, L., Fu-Yuan, H., 2004. Transmission of cytomegalovirus from mothers to preterm infants by breast milk. *Pediatr. Infect. Dis. J.* 23, 848–851.
- Kalejta, R.F., 2008. Tegument proteins of human cytomegalovirus. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 72, 249–265, table of contents.
- Kamil, J.P., Coen, D.M., 2007. Human cytomegalovirus protein kinase UL97 forms a complex with the tegument phosphoprotein pp65. *J. Virol.* 81, 10659–10668.
- Kasprzak, A., Zabel, M., Wysocki, J., Biczysko, W., Surdyk-Zasada, J., Olejnik, A., Gorczynski, J., Jurczynsyn, D., 2000. Detection of DNA, mRNA and early antigen of the human cytomegalovirus using the immunomax technique in autopsy material of children with intrauterine infection. *Virchows Arch* 437, 482–490.
- Kemble, G.W., McCormick, a L., Pereira, L., Mocarski, E.S., 1987. A cytomegalovirus protein with properties of herpes simplex virus ICP8: partial purification of the polypeptide and map position of the gene. *J. Virol.* 61, 3143–3151.
- Kern, E.R., Bidanset, D.J., Hartline, C.B., Yan, Z., Zemlicka, J., Quenelle, D.C., 2004. Oral activity of a methylenecyclopropane analog, cyclopropavir, in animal models for cytomegalovirus infections. *Antimicrob. Agents Chemother.* 48, 4745–4753.

- Kern, E.R., Kushner, N.L., Hartline, C.B., Williams-Aziz, S.L., Harden, E.A., Zhou, S., Zemlicka, J., Prichard, M.N., 2005. In vitro activity and mechanism of action of methylenecyclopropane analogs of nucleosides against herpesvirus replication. *Antimicrob. Agents Chemother.* 49, 1039–1045.
- Kim, W., Badley, A., Wiesner, R., 2000. The economic impact of cytomegalovirus infection after liver transplantation. *Transplantation* 69, 357–361.
- Kimberlin, D.W., 2012. Antiviral Agents. In: Long, S.S., Pickering, L.K., Prober, C.G. (Eds.), *Principles and Practice of Pediatric Infectious Diseases*. Elsevier Inc, pp. 1512–1518.
- Kinzler, E.R., Compton, T., 2005. Characterization of Human Cytomegalovirus Glycoprotein-Induced Cell-Cell Fusion Characterization of Human Cytomegalovirus Glycoprotein-Induced Cell-Cell Fusion. *J. Virol.* 79, 7828–7837.
- Komatsu, T.E., Pikis, A., Naeger, L.K., Harrington, P.R., 2014. Resistance of human cytomegalovirus to ganciclovir/valganciclovir: A comprehensive review of putative resistance pathways. *Antiviral Res.*
- Kotton, C.N., Kumar, D., Caliendo, A.M., Asberg, A., Chou, S., Danziger-Isakov, L., Humar, A., 2013. Updated international consensus guidelines on the management of cytomegalovirus in solid-organ transplantation. *Transplantation* 96, 333–60.
- Kouzarides, T., Bankier, A.T., Satchwell, S.C., Weston, K., Tomlinson, P., Barrell, B.G., 1987. Sequence and transcription analysis of the human cytomegalovirus DNA polymerase gene. *J Virol* 61, 125–133.
- Krause, P.R., Bialek, S.R., Boppana, S.B., Griffiths, P.D., Laughlin, C.A., Ljungman, P., Mocarski, E.S., Pass, R.F., Read, J.S., Schleiss, M.R., Plotkin, S.A., 2014. Priorities for CMV vaccine development. *Vaccine* 32, 4–10.
- Krosky, P.M., Baek, M., Coen, D.M., 2003. The Human Cytomegalovirus UL97 Protein Kinase , an Antiviral Drug Target , Is Required at the Stage of Nuclear Egress The Human Cytomegalovirus UL97 Protein Kinase , an Antiviral Drug Target , Is Required at the Stage of Nuclear Egress †. *J Ournal V Irology* 77, 905–914.
- Kuchta, R.D., Mizrahi, V., Benkovic, P. a., Johnson, K. a., Benkovic, S.J., 1987. Kinetic Mechanism of DNA Polymerase I (Klenow). *Biochemistry* 26, 8410–8417.

- LaFemina, R., Hayward, G.S., 1986. Constitutive and retinoic acid-inducible expression of cytomegalovirus immediate-early genes in human teratocarcinoma cells. *J. Virol.* 58, 434–440.
- Lanari, M., Lazzarotto, T., Venturi, V., Papa, I., Gabrielli, L., Guerra, B., Landini, M.P., Faldella, G., 2006. Neonatal Cytomegalovirus Blood Load and Risk of Sequelae in Symptomatic and Asymptomatic Congenitally Infected Newborns Marcello. *Pediatrics* 117, 76–83.
- Li, N., Thompson, S., Jiang, H., Lieberman, P.M., Luo, C., 2010. Development of Drugs for Epstein - Barr virus using High- Throughput in silico Virtual Screening. *Expert Opin Drug Discov* 5, 1189–1203.
- Li, Y., Korolev, S., Waksman, G., 1998. Crystal structures of open and closed forms of binary and ternary complexes of the large fragment of *Thermus aquaticus* DNA polymerase I: Structural basis for nucleotide incorporation. *EMBO J.* 17, 7514–7525.
- 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.
- Lischka, P., Michel, D., Zimmermann, H., 2016. Characterization of cytomegalovirus breakthrough events in a phase 2 prophylaxis trial of letermovir (AIC246, MK 8228). *J. Infect. Dis.* 213, 23–30.
- Littler, E., Stuart, A.D., Chee, M.S., 1992. Human cytomegalovirus UL97 open reading frame encodes a protein that phosphorylates the antiviral nucleoside analogue ganciclovir. *Nature* 358, 160–162.
- Liu, F., Zhou, Z.H., 2007. Comparative virion structures of human herpesviruses. 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 University Press, Cambridge, pp. 1408–1428.
- Liu, S., Knafels, J.D., Chang, J.S., Waszak, G.A., Baldwin, E.T., Deibel, M.R., 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., 2004a. 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., Appleton, B.A., Hogle, J.M., Coen, D.M., 2004b. Specific residues in the connector loop of the human cytomegalovirus DNA polymerase accessory protein UL44 are crucial for interaction with the UL54 catalytic subunit. *J. Virol.* 78, 9084–9092.
- Loregian, A., Rigatti, R., Murphy, M., Schievano, E., Palu, G., Marsden, H.S., 2003. Inhibition of human cytomegalovirus DNA polymerase by C-terminal peptides from the UL54 subunit. *J. Virol.* 77, 8336–8344.
- Lurain, N.S., Chou, S., 2010. Antiviral drug resistance of human cytomegalovirus. *Clin. Microbiol. Rev.* 23, 689–712.
- Magee, W., Hostetler, K., Evans, D., 2005. Mechanism of inhibition of vaccinia virus DNA polymerase by cidofovir diphosphate. *Antimicrob. agents ...* 49, 3153–3162.
- Malm, G., Engman, M.L., 2007. Congenital cytomegalovirus infections. *Semin Fetal Neonatal Med* 12, 154–159.
- Mar, E.C., Chiou, J.F., Cheng, Y.C., Huang, E.S., 1985. Inhibition of cellular DNA polymerase alpha and human cytomegalovirus-induced DNA polymerase by the triphosphates of 9-(2-hydroxyethoxymethyl)guanine and 9-(1,3-dihydroxy-2-propoxymethyl)guanine. *J. Virol.* 53, 776–80.
- Mar, E.C., Patel, P.C., Huang, E.S., 1981. Human cytomegalovirus-associated DNA polymerase and protein kinase activities. *J. Gen. Virol.* 57, 149–156.
- Marschall, M., Stamminger, T., Urban, A., Wildum, S., Ruebsamen-Schaeff, H., Zimmermann, H., Lischka, P., 2012. In vitro evaluation of the activities of the novel anticytomegalovirus compound AIC246 (letermovir) against herpesviruses and other human pathogenic viruses. *Antimicrob. Agents Chemother.* 56, 1135–1137.
- Marshall, B.C., Koch, W.C., 2009. Antivirals for Cytomegalovirus Infection in Neonates and Infants. *Pediatr Drugs* 25, 309–321.
- Martin, D.F., Sierra-Madero, J., Walmsley, S., Wolitz, R. a, Macey, K., Georgiou, P., Robinson, C. a, Stempien, M.J., 2002. A controlled trial of valganciclovir as induction therapy for cytomegalovirus retinitis. *N. Engl. J. Med.* 346, 1119–1126.

- 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.
- Marty, F.M., Boeckh, M., 2011. Maribavir and human cytomegalovirus-what happened in the clinical trials and why might the drug have failed? *Curr. Opin. Virol.* 1, 555–562.
- Marty, F.M., Ljungman, P., Papanicolaou, G.A., Winston, D.J., Chemaly, R.F., Strasfeld, L., Young, J.A.H., Rodriguez, T., Maertens, J., Schmitt, M., Einsele, H., Ferrant, A., Lipton, J.H., Villano, S.A., Chen, H., Boeckh, M., 2011. Maribavir prophylaxis for prevention of cytomegalovirus disease in recipients of allogeneic stem-cell transplants: A phase 3, double-blind, placebo-controlled, randomised trial. *Lancet Infect. Dis.* 11, 284–292.
- Mccormick, A.L., Mocarski, E.S., 2015. The immunological underpinnings of vaccinations to prevent cytomegalovirus disease. *Cell. Mol. Immunol.* 12, 170–179.
- Mcvoy, M.A., 2013. Cytomegalovirus Vaccines. *Clin. Infect. Dis.* 57, 196–199.
- McVoy, M.A., Adler, S.P., 1994. Human cytomegalovirus DNA replicates after early circularization by concatemer formation, and inversion occurs within the concatemer. *J. Virol.* 68, 1040–1051.
- Milbradt, J., Auerochs, S., Marschall, M., 2007. Cytomegaloviral proteins pUL50 and pUL53 are associated with the nuclear lamina and interact with cellular protein kinase C. *J. Gen. Virol.* 88, 2642–2650.
- Mocarski, E.S., Roizman, B., 1982. Structure and role of the herpes simplex virus DNA termini in inversion, circularization and generation of virion DNA. *Cell* 31, 89–97.
- Mocarski, E.S., Shenk, T., Griffiths, P., Pass, R.F., 2013. Cytomegaloviruses. In: Knipe, D.M., Howley, P.M. (Eds.), *Fields Virology*. Wilkins, Lippincott Williams & Wilkins, pp. 1960–2014.
- Moorman, N.J., Sharon-Friling, R., Shenk, T., Cristea, I.M., 2010. A Targeted Spatial-Temporal Proteomics Approach Implicates Multiple Cellular Trafficking Pathways in Human Cytomegalovirus Virion Maturation. *Mol. Cell. Proteomics* 9, 851–860.

- Mücke, K., Paulus, C., Bernhardt, K., Gerrer, K., Schön, K., Fink, A., Sauer, E.-M., Asbach-Nitzsche, A., Harwardt, T., Kieninger, B., Kremer, W., Kalbitzer, H.R., Nevels, M., 2014. Human cytomegalovirus major immediate early 1 protein targets host chromosomes by docking to the acidic pocket on the nucleosome surface. *J. Virol.* 88, 1228–48.
- Mulamba, G.B., Hu, A., Azad, R.F., Anderson, K.P., Coen, D.M., 1998. Human cytomegalovirus mutant with sequence-dependent resistance to the phosphorothioate oligonucleotide fomivirsen (ISIS 2922). *Antimicrob. Agents Chemother.* 42, 971–973.
- Murphy, E., Shenk, T., 2008. Human Cytomegalovirus Genome. In: Shenk, T., Stinski, M.F. (Eds.), *Human Cytomegalovirus*. Springer-Verlag Berlin Heidelberg, Heidelberg, pp. 2–19.
- Naing, Z.W., Scott, G.M., Shand, A., Hamilton, S.T., van Zuylen, W.J., Basha, J., Hall, B., Craig, M.E., Rawlinson, W.D., 2015. Congenital cytomegalovirus infection in pregnancy: A review of prevalence, clinical features, diagnosis and prevention. *Aust. New Zeal. J. Obstet. Gynaecol.* 9–18.
- Nassetta, L., Kimberlin, D., Whitley, R., 2009. Treatment of congenital cytomegalovirus infection: Implications for future therapeutic strategies. *J. Antimicrob. Chemother.* 63, 862–867.
- Nelson, J.A., Landais, I., 2013. Functional genomics approaches to understand cytomegalovirus replication, latency and pathogenesis. *Curr. Opin. Virol.* 3, 408–415.
- 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.
- Oberg, B., 1989. Antiviral Effects of Phosphonoformate. *Pharmac. 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., Anders, D.G., 1993. Eleven loci encoding trans-acting factors are required for transient complementation of human cytomegalovirus oriLyt-dependent DNA replication. *J. Virol.* 67, 6979–6988.

- Pass, R.F., Zhang, C., Evans, A., Simpson, T., Andrews, W., Huang, M.-L., Corey, L., Hill, J., Davis, E., Flanigan, C., Cloud, G., 2009. Vaccine prevention of maternal cytomegalovirus infection. *N. Engl. J. Med.* 360, 1191–1199.
- Patil, A.J., Sharma, A., Kenney, M.C., Kuppermann, B.D., 2010. Valganciclovir in the treatment of cytomegalovirus retinitis in HIV-infected patients. *Clin. Ophthalmol.* 4, 111–119.
- Pelletier, H., Sawaya, M.R., Kumar, A., Wilson, S.H., Kraut, J., 1994. Structures of Ternary Complexes (ddI), and 2',3'-dideoxycytidine (ddC) are all anti-HIV drugs (2, 3) that become potent of Rat DNA Polymerase, a DNA chain termination inhibitors of RT after they are converted by cellular kinases (4, 5), in vivo, to their. *Science* (80- ). 264, 1891–1903.
- Picard-Jean, F., Bougie, I., Bisailon, M., 2007. Characterization of the DNA- and dNTP-binding activities of the human cytomegalovirus DNA polymerase catalytic subunit UL54. *Biochem. J.* 407, 331–41.
- Piret, J., Goyette, N., Eckenroth, B.E., Drouot, E., Götte, 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.
- Plotkin, S., 2015. The history of vaccination against cytomegalovirus. *Med. Microbiol. Immunol.* 204, 247–254.
- Plotkin, S.A., Huang, E.S., 1985. Cytomegalovirus Vaccine Virus ( Towne Strain ) Does Not Induce Latency. *J. Infect. Dis.* 152, 395–397.
- Poole, E., Sinclair, J., 2015. Sleepless latency of human cytomegalovirus. *Med. Microbiol. Immunol.*
- Prichard, M.N., Britt, W.J., Daily, S.L., Hartline, C.B., Kern, E.R., 2005. Human Cytomegalovirus UL97 Kinase Is Required for the Normal Intranuclear Distribution of pp65 and Virion Morphogenesis. *J. Virol.* 79, 15494–15502.
- Rafailidis, P.I., Mourtzoukou, E.G., Varbobitis, I.C., Falagas, M.E., 2008. Severe cytomegalovirus infection in apparently immunocompetent patients: a systematic review. *Virol J* 5, 47.

- Razonable, R.R., 2008. Cytomegalovirus infection after liver transplantation: Current concepts and challenges. *World J. Gastroenterol.* 14, 4849–4860.
- Razonable, R.R., Paya, C. V, Smith, T.F., 2002. Role of the Laboratory in Diagnosis and Management of Cytomegalovirus Infection in Hematopoietic Stem Cell and Solid-Organ Transplant Recipients. *J. Clin. Microbiol.* 40, 746–752.
- Reap, E.A., Dryga, S.A., Morris, J., Rivers, B., Norberg, P.K., Olmsted, R.A., Chulay, J.D., 2007. Cellular and humoral immune responses to alphavirus replicon vaccines expressing cytomegalovirus pp65, IE1, and gB proteins. *Clin. Vaccine Immunol.* 14, 748–755.
- Revello, M.G., Gerna, G., 2010. Human cytomegalovirus tropism for endothelial/epithelial cells: scientific background and clinical implications. *Rev. Med. Virol.* 20, 136–155.
- Ryckman, B.J., Rainish, B.L., Chase, M.C., Borton, J.A., Nelson, J.A., Jarvis, M.A., Johnson, D.C., 2008. Characterization of the human cytomegalovirus gH/gL/UL128-131 complex that mediates entry into epithelial and endothelial cells. *J. Virol.* 82, 60–70.
- Saffert, R.T., Kalejta, R.F., 2006. Inactivating a cellular intrinsic immune defense mediated by Daxx is the mechanism through which the human cytomegalovirus pp71 protein stimulates viral immediate-early gene expression. *J. Virol.* 80, 3863–3871.
- Sahoo, M.K., Lefterova, M.I., Yamamoto, F., Waggoner, J.J., Chou, S., Holmes, S.P., Anderson, M.W., Pinsky, B.A., 2013. Detection of cytomegalovirus drug resistance mutations by next-Generation sequencing. *J. Clin. Microbiol.* 51, 3700–3710.
- 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.
- Shi, J., McKenna, B.J., 2016. Cytomegalovirus-induced inflammatory pseudotumour. *Pathology* 48, 750–752.
- 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.
- Sinclair, J., 2008. Human cytomegalovirus: Latency and reactivation in the myeloid lineage. *J. Clin. Virol.* 41, 180–185.

- Sinclair, J.H., Reeves, M.B., 2013. Human cytomegalovirus manipulation of latently infected cells. *Viruses*.
- Smith, I.L., Cherrington, J.M., Jiles, R.E., Fuller, M.D., Freeman, W.R., Spector, S. a, 1997. High-level resistance of cytomegalovirus to ganciclovir is associated with alterations in both the UL97 and DNA polymerase genes. *J. Infect. Dis.* 176, 69–77.
- Smith, M.G., 1956. Propagation in Tissue Cultures of a Cytopathogenic Virus from Human Salivary Gland Virus (SGV) Disease. *Proceeding Soc. Exp. Biol. Med.* 92, 424–430.
- Smith, R.M., Kosuri, S., Kerry, J.A., 2014. Role of human cytomegalovirus tegument proteins in virion assembly. *Viruses* 6, 582–605.
- Stinski, M.F., Meier, J.L., 2007. Immediate – early viral gene regulation and function. 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 University Press, USA, pp. 241–263.
- Strang, B.L., 2015. Viral and cellular subnuclear structures in human cytomegalovirus-infected cells. *J. Gen. Virol.* 96, 239–253.
- Strang, B.L., Coen, D.M., 2010. Interaction of the human cytomegalovirus uracil DNA glycosylase UL114 with the viral DNA polymerase catalytic subunit UL54. *J. Gen. Virol.* 91, 2029–2033.
- Swan, S.K., Smith, W.B., Marbury, T.C., Schumacher, M., Dougherty, C., Mico, B. a, Villano, S. a, 2007. Pharmacokinetics of maribavir, a novel oral anticytomegalovirus agent, in subjects with varying degrees of renal impairment. *J. Clin. Pharmacol.* 47, 209–17.
- Talarico, C.L., Burnette, T.C., Miller, W.H., Smith, S.L., Davis, M.G., Stanat, S.C., Ng, T.I., He, Z., Coen, D.M., Roizman, B., Biron, K.K., 1999. Acyclovir is phosphorylated by the human cytomegalovirus UL97 protein. *Antimicrob. Agents Chemother.* 43, 1941–1946.
- Tandon, R., Mocarski, E.S., 2012. Viral and host control of cytomegalovirus maturation. *Trends Microbiol.* 20, 392–401.
- Tchesnokov, E.P., Gilbert, C., Boivin, G., Götte, M., 2006. Role of helix P of the human cytomegalovirus DNA polymerase in resistance and hypersusceptibility to the antiviral drug foscarnet. *J. Virol.* 80, 1440–50.

- Tchesnokov, E.P.T., Obikhod, A., Schinazi, R.F., Götte, M., 2009. Engineering of a chimeric RB69 DNA polymerase sensitive to drugs targeting the cytomegalovirus enzyme. *J. Biol. Chem.* 284, 26439–26446.
- Togashi, J., Sugawara, Y., Hashimoto, M., Tamura, S., Kaneko, J., Aoki, T., Hasegawa, K., Kokudo, N., 2011. Oral valganciclovir versus intravenous ganciclovir as preemptive treatment for cytomegalovirus infection after living donor liver transplantation: A randomized trial. *Biosci. Trends* 5, 217–222.
- Tooze, J., Hollinshead, M., Reis, B., Radsak, K., Kern, H., 1993. Progeny vaccinia and human cytomegalovirus particles utilize early endosomal cisternae for their envelopes. *Eur. J. Cell Biol.* 60, 163–178.
- 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.
- Trofe, J., Pote, L., Wade, E., Blumberg, E., Bloom, R.D., 2008. Maribavir: A novel antiviral agent with activity against cytomegalovirus. *Ann. Pharmacother.* 42, 1447–1457.
- 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.
- Vergheese, P.S., Schleiss, M.R., 2013. Letermovir Treatment of Human Cytomegalovirus Infection Antiinfective Agent. *Drugs Future* 38, 291–298.
- Wang, J., Sattar, A.K.M.A., 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.
- Wen, Y.-M., Wang, Y.-X., 2009. Biological features of hepatitis B virus isolates from patients based on full-length genomic analysis. *Rev. Med. Virol.* 19, 57–64.
- Wilkinson, G.W.G., Davison, A.J., Tomasec, P., Fielding, C.A., Aicheler, R., Murrell, I., Seirafian, S., Wang, E.C.Y., Weekes, M., Lehner, P.J., Wilkie, G.S., Stanton, R.J., 2015. Human cytomegalovirus: taking the strain. *Med. Microbiol. Immunol.*

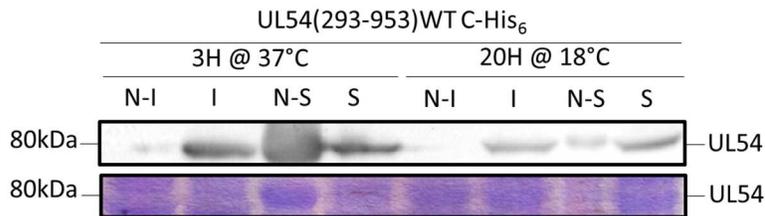
- Winston, D.J., Saliba, F., Blumberg, E., Abouljoud, M., Garcia-Diaz, J.B., Goss, J.A., Clough, L., Avery, R., Limaye, A.P., Ericzon, B.G., Navasa, M., Troisi, R.I., Chen, H., Villano, S.A., Uknis, M.E., 2012. Efficacy and safety of maribavir dosed at 100 mg orally twice daily for the prevention of cytomegalovirus disease in liver transplant recipients: A randomized, double-blind, multicenter controlled trial. *Am. J. Transplant.* 12, 3021–3030.
- 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.
- Zahn, K.E., Tchesnokov, E.P., Götte, M., Doublin, S., 2011. Phosphonoformic acid inhibits viral replication by trapping the closed form of the DNA polymerase. *J. Biol. Chem.* 286, 25246–25255.
- Zegrí Reiriz, I., Gómez-Bueno, M., Segovia Cubero, J., 2015. Successful Use of Maribavir for Drug-resistant Cytomegalovirus Colitis in a Heart Transplant Recipient. *Rev Esp Cardiol* 68, 908–909.
- 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.

## ANNEXES

MFFNPYLSGGVTGGAVAGRRQRSQPGSAQGSGRPPQKQFLQIVPRGVMFDGQTGLIKHKTGRLPLMFYREIKH  
 LLSHDMVWPCPWRETLVGRVVGPIRFHTYDQTDVLFDDSPENVSPRYRQHLPVPSGNVLRFFGATEHGYSICVNVF  
 GQRSYFYCEYSDTDRLEVIASVGEVPEPRTPYAVSVTPATKTSIYGYGTRPVPDLQCVSISNWTMARKIGEYLLEQGF  
 PVYEVVVDPLTRLVIDRRITTFGWCSVNRYDWRQQGRASTCDIEVDCDVSDLVAVPDDSSWPRYRCLSF<sup>DI</sup>ECMSGE  
 GGFPCAESDDIVIQISVCYETGGNTAVDQGI<sup>PN</sup>GN<sup>DR</sup>GCTSEGVIFGHSGLH<sup>LF</sup>TIGTCGQVGP<sup>DV</sup>DVYEF<sup>P</sup>SEY  
 ELLLGFM<sup>LF</sup>FQRYAPAFVTGYNINSFDLKYILTRLEYLYK<sup>VD</sup>SQR<sup>FC</sup>KLPTAQGG<sup>RF</sup>FLHSPAVG<sup>FK</sup>RQYAAAFPSASHN  
 NPASTAATKVYIAGSVVIDMYPVCMAKTNSPNYKLN<sup>TMA</sup>E<sup>LY</sup>LRQRK<sup>DDL</sup>SYK<sup>DI</sup>PRCFVANAEGRAQVGRYCLQD  
 AVLVRDLFNTINFHYEAGAIARLAKIPLRRVIFD<sup>GQ</sup>QIRIY<sup>TSL</sup>LDECACRDFILPNHYSK<sup>GT</sup>TPETNSVAVSPNAAI<sup>ST</sup>  
 AAVPGDAGSVAAMFQMS<sup>P</sup>PLQ<sup>S</sup>APSSQD<sup>G</sup>VLPGSGSN<sup>SS</sup>SVGVF<sup>SV</sup>GSGSSGGVGSND<sup>SH</sup>GAGGTAAVSYQ<sup>G</sup>  
 ATVFEPEVGYNDPVAVDFASLYPSIIMAHNLCY<sup>ST</sup>LLVPGGEYPVDPADV<sup>SV</sup>TL<sup>ENG</sup>V<sup>THR</sup>FVRASVRVSVLSELL  
 NK<sup>W</sup>VSQRRAVRECMRECQDPVRRMLLDKEQMALKV<sup>TC</sup>NAFYGFTGVVNGMMPCLPIAASITRIGRDM<sup>LERT</sup>ARF  
 IKDNFSEPCFLHNFFNQEDYV<sup>VG</sup>TREGDSEES<sup>TL</sup>PEGLE<sup>TSS</sup>GSDERRVEARVIYGD<sup>TDS</sup>VFVFRGLTPQALVARG  
 PSLAHYV<sup>TACL</sup>FV<sup>PK</sup>LEFEK<sup>V</sup>FVSLMMICKKRYIGKVEGASGLSMKGV<sup>DL</sup>VRKTACEFVKGVTRD<sup>VLS</sup>LLFEDREVS  
 EAAVRLSRLS<sup>DEV</sup>KKYGVPRGFWRILRRLVQARDD<sup>LY</sup>LHRVRVEDL<sup>VSS</sup>VLSKDISLYRQSNLPHIAV<sup>IK</sup>RLAARSEEL  
 PSVGDRV<sup>FY</sup>LTAPGVRTAPQGS<sup>SD</sup>NGDSVTTGVVSRSDAIDGTDD<sup>DAD</sup>GGGVEESNRRGGEP<sup>AK</sup>KRARKPPSVVC  
 NYEVAEDPSYVREHGVP<sup>I</sup>HADKYFEQVLKAVTNVLS<sup>P</sup>VFPGGETARKDKFLHMVLP<sup>RR</sup>LHLEPAFLPYSVKAHECC

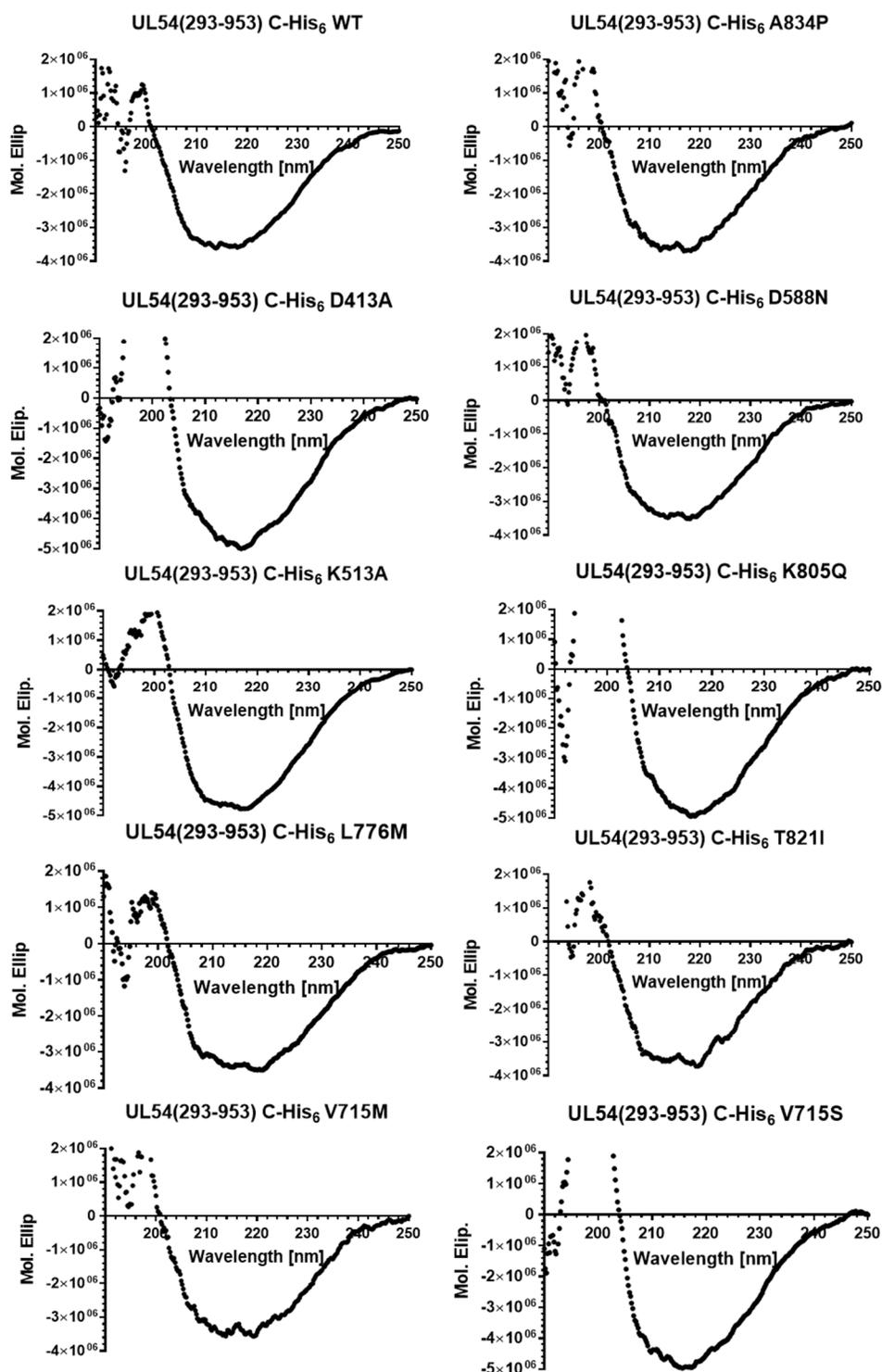
### Annexe 1 – Séquence en acide aminé de l’ADN polymérase UL54 de HCMV

La séquence de la portion catalytique qui a été clonée et qui représente la protéine recombinante utilisée dans ce mémoire correspond à la séquence en bleue. Le tryptophane utilisé lors des analyses en spectroscopie à fluorescence est en rouge.



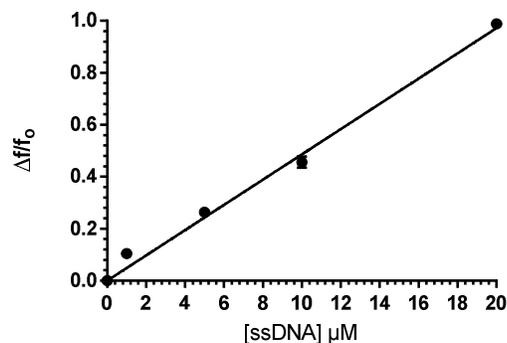
### Annexe 2 - Test d’expression et de solubilité de la protéine recombinante UL54(293-953) C-His<sub>6</sub> WT.

L’induction de l’expression par les cellules *E. coli* transformées a été faite avec 0,4mM IPTG et 2% EtOH final. Les fractions non-induite, induite, non-soluble et soluble sont indiquées respectivement par N-I, I, N-S et S. La portion du haut montre le résultat de l’immunobuvardage de type Western effectué avec un anticorps Penta-His à la suite d’une exposition de 4 secondes. La portion du bas montre le gel SDS-PAGE coloré au bleu de Coomassie.



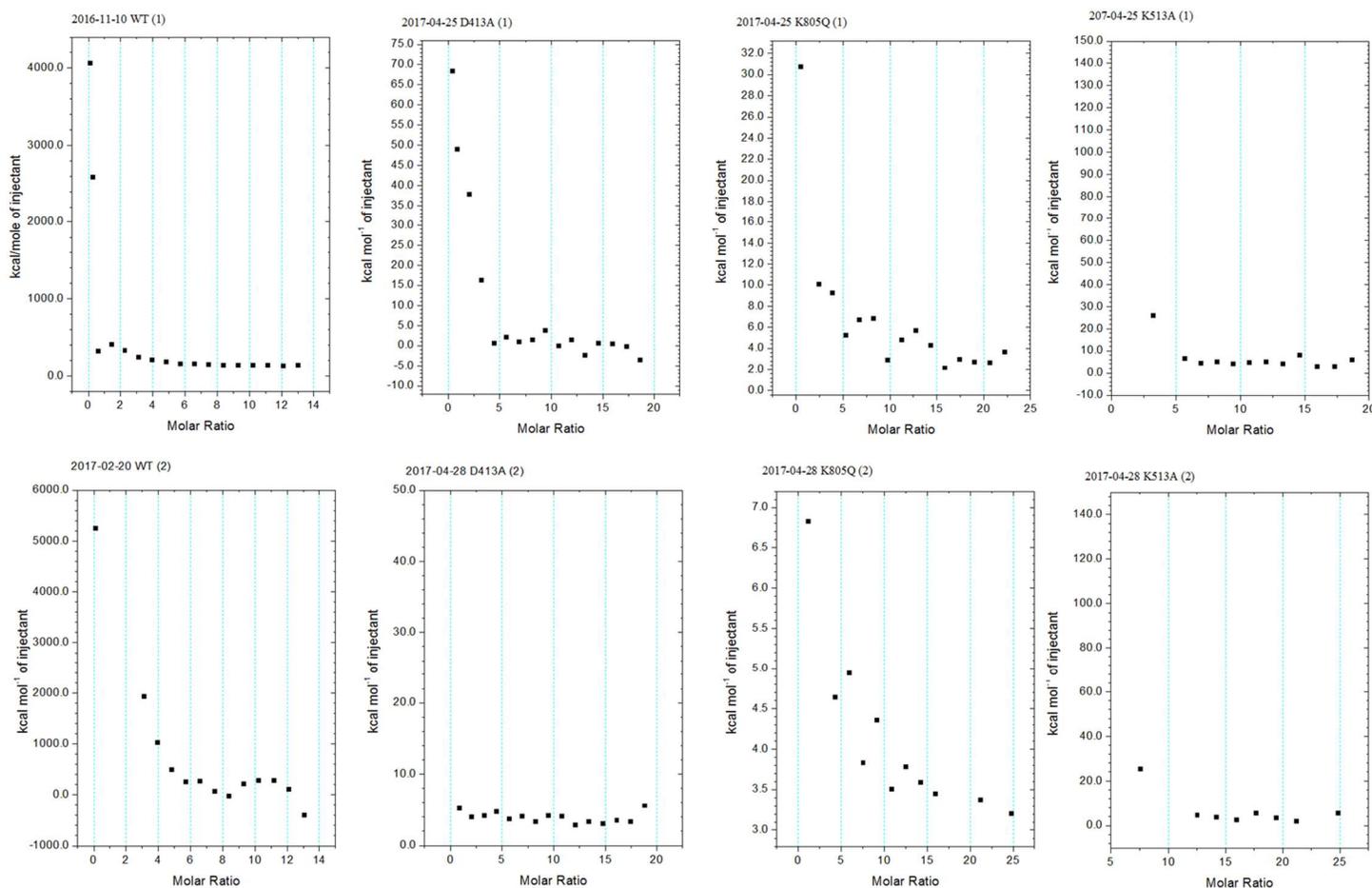
### Annexe 3 – Spectres dichroïques des différentes protéines recombinantes

Chaque spectre a été produit avec 1.5 $\mu$ M de protéine recombinante. Ces spectres ont été obtenus à la suite du balayage dans l'UV-lointain (250-190nm), à 22°C et avec 5 accumulations. La cuvette utilisée est une de quartz ayant un parcours optique de 1mm.



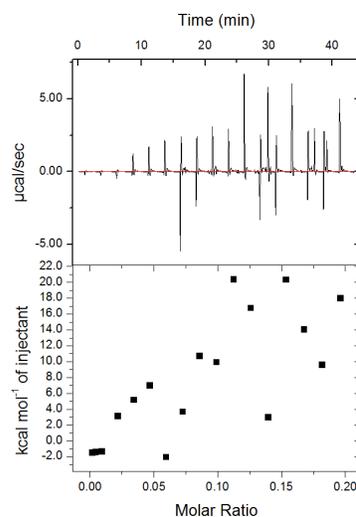
#### Annexe 4 – Interaction de la protéine GST recombinante avec l'ADNsb.

Aucune interaction n'est détectée ici. En effet, puisque la courbe de liaison est linéaire cela démontre que la diminution de l'émission des tryptophanes de la protéine recombinante GST est simplement provoquée par le «quenching» provoqué par l'ADNsb en solution.



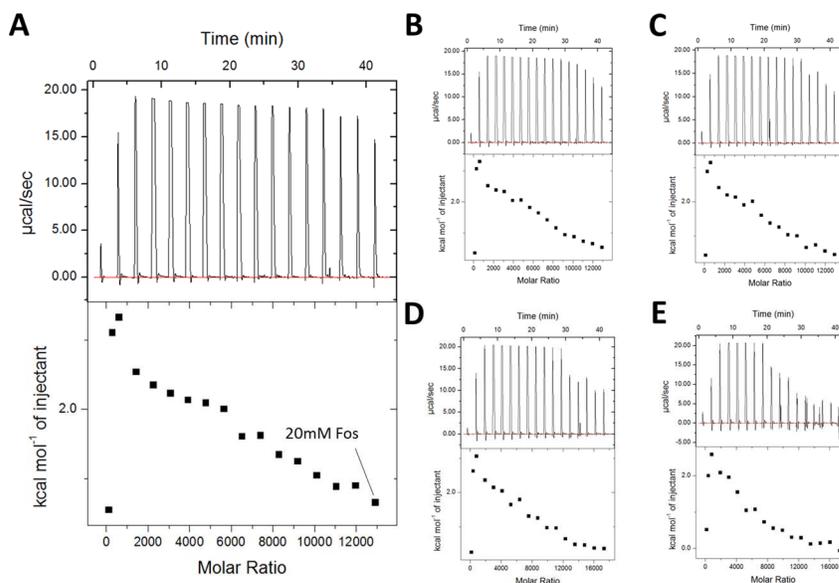
#### Annexe 5 – Résultats obtenus en microcalorimétrie pour les protéines recombinantes mutantes reconnues pour être sensible au foscarnet.

L'interaction du FOS avec les protéines recombinantes a été étudiée en duplicata (spectre haut/bas). Toutes présentent une liaison de type endothermique.



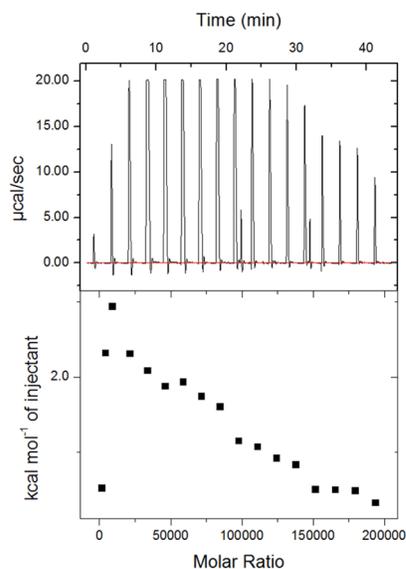
### Annexe 6 – Effet de dilution observé de 20 $\mu$ M foscarnet injecté dans le tampon de liaison.

Résultat obtenu en microcalorimétrie d'une solution mère de 100 $\mu$ M FOS injecté dans la cellule échantillon qui contenait du tampon de liaison en absence de protéines. La concentration finale de FOS dans la cellule d'échantillon était 20 $\mu$ M. Ce résultat est le même que ce qui est obtenu pour les protéines recombinantes possédant une mutation ponctuelle qui est associée à une résistance antivirale.



### Annexe 7 – Résultats obtenus en microcalorimétrie pour les protéines recombinantes mutantes reconnues pour être résistante au foscarnet.

Ces essais ont été faits avec une solution mère de 100mM FOS permettant d'obtenir une concentration finale de 20mM FOS, soit mille fois plus concentrée que les essais où l'interaction du FOS a été détectée avec les protéines recombinantes reconnues pour être sensibles au FOS et avec celle de type sauvage. [A] Mutant A834P. [B] Mutant V715M. [C] Mutant T821I. [D] Mutant D588N. [E] Mutant L776M.



**Annexe 8 - Effet de dilution observé de 20mM foscarnet injecté dans le tampon de liaison.**

Résultat obtenu en microcalorimétrie d'une solution mère de 100mM FOS injecté dans la cellule échantillon qui contenait du tampon de liaison en absence de protéines. La concentration finale de FOS dans la cellule d'échantillon était 20mM. Ce résultat est le même que ce qui est obtenu pour les protéines recombinantes possédant une mutation ponctuelle qui est associée à une résistance antivirale.