



HAL
open science

Etude des protéines du cytomegalovirus humain impliquées dans l'étape d'encapsidation en vue du développement de nouvelles thérapies

Clotilde Muller

► **To cite this version:**

Clotilde Muller. Etude des protéines du cytomegalovirus humain impliquées dans l'étape d'encapsidation en vue du développement de nouvelles thérapies. Médecine humaine et pathologie. Université de Limoges, 2022. Français. NNT : 2022LIMO0073 . tel-04810594

HAL Id: tel-04810594

<https://theses.hal.science/tel-04810594v1>

Submitted on 29 Nov 2024

HAL is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.

UNIVERSITE DE LIMOGES

ECOLE DOCTORALE BIOLOGIE-SANTE, ED 615

UMR Inserm 1092 : Anti-infectieux, supports moléculaires des résistances et innovations thérapeutiques

Thèse pour obtenir le grade de

DOCTEUR DE L'UNIVERSITE DE LIMOGES

Discipline : Biologie, Médecine et Santé

Spécialité : Immunologie, oncologie, inflammation et infectiologie

**Étude des protéines du cytomegalovirus humain
impliquées dans l'étape d'encapsidation en vue du
développement de nouvelles thérapies**

Présentée et soutenue par

Clotilde MULLER

Le 9 novembre 2022

Thèse dirigée par le Professeur **Sébastien HANTZ**

JURY

Pr Jacques IZOPET , PU-PH, Université de Toulouse	Président
Pr Nicolas LÉVÊQUE , PU-PH, Université de Poitiers	Rapporteur
Dr Sylvie PILLET , MCU-PH, Université de St-Etienne	Rapporteur
Pr Sophie ALAIN , PU-PH, Université de Limoges	Examineur
Pr Sébastien HANTZ , PU-PH, Université de Limoges	Examineur
Dr Sébastien LEGARDINIER , MCU, Université de Limoges	Membre invité



*À mes grands-parents,
À mes parents,
À mon frère*

Étudie, non pour savoir plus, mais pour savoir mieux.
Sénèque, *Lettres à Lucilius*

REMERCIEMENTS

Au cours de ces trois dernières années (2019-2022), j'ai été témoin de souvenirs inoubliables qui resteront gravés dans ma mémoire. Les travaux présentés dans ce manuscrit impliquent de nombreuses personnes que je souhaiterais remercier.

Tout d'abord, je tiens à remercier l'ensemble du jury d'avoir accepté de juger cette thèse, qui, je l'espère, aura su éveiller son intérêt. Je remercie le **Pr Nicolas Lévêque** et le **Dr Sylvie Pillet** d'avoir accepté avec enthousiasme d'évaluer ces travaux. Je remercie également le **Pr Jacques Izopet** d'être membre de ce jury en tant que président. Soyez assurés de ma reconnaissance.

Je tiens à transmettre mes remerciements au **Pr Marie-Cécile Ploy**. Merci de m'avoir accueillie au sein de l'unité UMR Inserm 1092. Merci de votre bienveillance.

Mes remerciements les plus sincères vont à mon directeur de thèse, le **Pr Sébastien Hantz**. Merci de m'avoir accordé ta confiance pour que je poursuive ce projet qui te tient tant à cœur. Au cours de ces trois années, tu m'as guidée et accompagnée avec patience sur différents axes de recherche. Merci pour toutes ces discussions et relectures, merci de t'être rendu disponible. Je suis arrivée en tant que néophyte concernant beaucoup de sujets, merci de m'avoir fait grandir.

Je poursuis mes remerciements en remerciant l'infatigable **Pr Sophie Alain**. Votre enthousiasme, votre énergie et vos centaines d'idées (à la minute) figurent une source de motivation pour l'ensemble de l'équipe. Merci de m'avoir accueillie au sein de la « team viro ». Merci pour vos précieux conseils lorsque j'étais en « panne ». Merci de m'avoir accordé votre confiance pour la conduite du projet pUL51, merci pour votre bienveillance.

Dr Sébastien Legardinier. Par ta patience, tes connaissances (exhaustives !) et ta bonne humeur, tu as su me transmettre avec simplicité beaucoup de compétences expérimentales concernant les baculovirus et les protéines recombinantes. Merci pour tout, et particulièrement pour les heures passées au microscope à la recherche de plages Ob -. Ton implication dans mon projet de thèse reste plus que souhaité, en plus de m'avoir accordé de ton temps, tu m'as conseillée et rassurée. Venir à la « FST » était toujours un plaisir ! J'ai notamment pu rencontrer **Marlène** (attention, maintenant docteur !) et **Nelly**, merci les filles pour votre accueil et pour toutes ces discussions. Nos instants de dégustation culinaire (club de GGG) demeureront gravés !

Émilie Pinault, merci pour ton travail et ta contribution concernant les analyses par spectrométrie de masse.

Je voudrais également remercier **Émilie Guérin** pour le séquençage Sanger et **Valentin Tilloy** pour les analyses du séquençage NGS. Un grand merci à **Mélissa Mayeras** et **Mathieu Lafarge** pour avoir participé aux PCRs et séquençage NGS d'*UL51*. Merci pour votre rapidité et votre capacité de travail.

Merci également à **Audrey Viargues** et **Claire Gourin** d'avoir été de superbes stagiaires.

Cette thèse n'aurait pas pu être réalisée sans le travail titanesque de mes prédécesseurs ; je pense notamment à **Gaël Champier**, **Sébastien Hantz**, **Anthony Couvreur**, **Raphaël Cazal**, et **Gaëtan Ligat**. Je tiens particulièrement à te remercier, **Gaëtan**, pour ton implication dans ce travail de thèse. Merci pour tes nombreuses relectures, ta rigueur, tes idées et ton partage d'expérience. Nos discussions, parfois difficiles, nous ont permis d'avancer et de partager une discipline que nous aimons. Je te souhaite un magnifique parcours professionnel et un bel envol à Toulouse !



Je tiens à remercier **l'ensemble des membres de l'UMR Inserm 1092**, que ce soient les chefs, les postdocs, les doctorants, les ingénieurs, les techniciens et les étudiants. Vous avez été d'un soutien moral et technique sans faille tout au long de ces trois années.

Un grand merci à **Cécile**, **Yohann** et **Linda** qui ont su m'enseigner l'art du clonage. **Thomas**, que serait ce labo sans toi ? Certainement pas le même ! Merci pour ton implication dans la vie de l'unité, pour toutes ces discussions et toutes ces blagues « typiquement scientifiques ». Grâce à tes livres, j'ai pu voyager dans le monde fascinant du microbiome. Merci **Aurélien** d'avoir partagé mes galères de western blot et de m'avoir fait part de tous ces petits tips qui rendent la recherche plus facile ☺, ensemble on est plus fort ! Merci, **Sandra** pour ton écoute et tes conseils sur les protéines. **Morgane** et **Mélanie**, vous êtes des filles formidables, courage pour votre fin de thèse, vous tenez le bon bout ! Merci **Ana** et **Audrey**, je garderai un super souvenir de notre congrès à Lisbonne et... des Gin Tonic ahaaa ! Vous êtes brillantes, la fin est proche, je vous souhaite une superbe carrière !

Je voudrais à présent te remercier, **Déborah (alias Taton chickon)**. Avoir partagé plus de la moitié de ma thèse à tes côtés m'a été extrêmement bénéfique ; tant pour ton aide scientifique, que pour ta douceur. Nous avons pu partager tellement de moments forts, je suis heureuse de te compter dans ma vie. PS J'ai retrouvé nos vieux dessins du complexe terminase, par rapport à la structure de l'HSV-1 publiée récemment, on y était presque !

Mathis, team moto casse-cou, merci pour tout ! Ces muffins fourrés au choco-noisette, ces plats, ta vision de la vie, ça va me manquer ! Je te souhaite un bel avenir pro, tu es un grand je sais que tu t'en sortiras ! Mister Mendez, oh grand **Damien** (team moto aussi), je suis tellement contente d'avoir pu te rencontrer, merci pour ta bonne humeur, tes coups de gueule et merci pour les Hirt, tu les fais à la perfection ;-)! **Nicoco Plault**, que la force soit avec toi ! Merci pour les cellules, pour m'avoir enseigné les BAC et surtout de m'avoir partagé ta culture cinématographique ! Votre présence au bureau m'a permis de décompresser sur cette fin de thèse, sans vous, ça aurait été différent, merci pour tout ! **Guillaume** et **Jessie**, vous avez formé une team de choc pour les effluents ! Je me souviendrai des repas-ciné-bureau devant Archer (et oui, il n'y avait pas que du négatif pendant le covid) !

Un grand merci à **Perrine** et à **Maxime**, d'abord les « médecins du bureau » et maintenant de véritables amis. Je suis heureuse de vous compter dans ma vie ! Vous avez une capacité de travail et d'analyse incroyable, mille mercis de m'avoir fait découvrir votre univers. Perrine, une douce pensée pour toutes ces galères partagées et ces coups de main qui font du bien. Maxime, rendez-vous à la Saint-Théodore ;D ?

À tous les autres collègues qui m'ont soutenue, de près ou de loin. À nos séjours Disney et La Rochelle : c'était trop bien !



Merci à la team MT180S, que cette aventure est fabuleuse ! **Christophe** merci pour ton humour, ton aide et tes conseils (précieux) sur la gestion du stress. **Michèle**, vivement qu'on aille déguster du bon vin ☺!! Merci pour ton accueil, tu es formidable ! **Siyao**, toujours un coup d'avance, tu es excellente, sache-le ! **Paul**, ses « phéropaul » et **Yannick** le magicien... ne changez rien : vous êtes extra !

Merci aux nombreux membres de l'association ADPlim, à ces soirées « réunion » et ces événements « bar tapas » si plaisants avant le confinement.

Je souhaite également remercier mes amis de fac, **Clément** (le Rieux), **Jonathan** et **Lucie**, **Julien Durant** et **Noémi Valentino**, vous avez été d'un soutien inestimable. Merci à mon binôme de BTS, **Baptiste Martin**. À nos manières (bien à nous) de réviser !

Merci à **mes amis de bagarre**, essentiels pour le maintien de ma santé mentale ; grâce à vous je dépasse mes limites à chaque séance. Merci **aux instructeurs** pour la qualité de leur enseignement. **Maxime**, ton soutien et tes encouragements (sportifs et scientifiques) m'ont permis d'aborder la vie avec plus de légèreté. Merci. À quand un nouveau ball trap ☺ ?

Léana, toujours là ! À nos larmes, à nos rires, à nos séances (musclées) de sport, à nos longues discussions dans la « clio campus », à nos sorties, à notre amitié... Je te remercie pour ta présence et pour ton soutien inconditionnel. Tout simplement : merci d'être là.

Mes derniers remerciements iront à ceux qui sont restés sur le front durant mon long, très long « voyage scientifique ».

À ma **famille**, à mes **grands-parents** et **parents** ; merci de m'avoir inculqué le goût de l'effort. **Maman**, malgré la distance (parfois très pesante) tu as toujours su trouver les mots et te rendre disponible. À mon plus grand plaisir, tu m'as rendu visite à chaque nouvelle destination de travail ; d'abord en Irlande lors de mon premier Erasmus, puis en Allemagne (quelle idée !), ensuite à Limoges (bon ok, le déménagement c'était pas fun) et enfin à Lisbonne avant le congrès. Ne sous-estime pas ton implication, tu m'as donné les moyens de courir après mes objectifs, c'était le plus beau cadeau que tu puisses me faire. **Papa**, tu m'as appris à tomber et à me relever ; ce sont éléments fondamentaux dans la vie comme dans la recherche. Et, promis, je ne partirai plus en courant après une présentation ^^.

Gaëtan, mon frère, toujours là quand on a besoin d'un conseil, mais jamais pour passer un coup de fil de routine. Tant pis pour le blabla ! Je t'aime fort, c'est l'essentiel.

À **Pierre**, mon chachou ; Je n'aurai pas les mots justes pour te dire combien ta présence et ton soutien sont chers à mes yeux. Merci pour tout l'amour que tu me donnes.

DROITS D'AUTEURS

Cette création est mise à disposition selon le Contrat :

« **Attribution-Pas d'Utilisation Commerciale-Pas de modification 3.0 France** »

disponible en ligne : <http://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/3.0/fr/>



AVANT PROPOS

Ce travail de thèse a été mené sous la direction du **Pr Sébastien Hantz** au sein de l'unité mixte de recherche intitulée « *Anti-Infectieux : supports moléculaires des résistances et innovations thérapeutiques* », **UMR-S 1092** située au **Centre de Biologie Recherche Santé** (CBRS) à Limoges. Cette unité de recherche, divisée en deux axes, est co-dirigée par le **Pr Marie-Cécile Ploy** et le **Pr Sophie Alain**.

Ce projet de doctorat a été financé par l'Université de Limoges à la suite de ma **sélection au concours** de l'école doctorale de Limoges (ED 615), mais aussi par l'Institut National de Santé et de la Recherche Médicale (INSERM) et par le Centre National de Référence (CNR) des Herpèsvirus. La bourse intitulée « *Molecular mechanism of essential patterns within HCMV terminase pUL56 for DNA packaging* » attribuée par la Société Européenne de Microbiologie Clinique et de Maladies Infectieuses (ESCMID) au **Dr Gaëtan Ligat** a également permis de financer une partie de ces travaux.

Collaboration :

Une partie du travail de thèse a été rendu possible grâce à la collaboration avec le **Dr Sébastien Legardinier** de l'unité de recherche **UR 22722** à Limoges.

Publications :

Articles parus dans des revues à comité de lecture nationale et internationale :

Ligat G., Muller C., Alain S., Hantz S. (2020). Le complexe terminase, une cible de choix dans le traitement de l'infection à cytomégalovirus humain.

Coste-Mazeau P., Alain S., Muller C., Andouard D., Hantz S. (2021). Infection de la femme enceinte par le cytomégalovirus : du dépistage au traitement.

Muller C., Alain S., Baumert T.F., Ligat G., Hantz S. (2021). Structures and divergent mechanisms in capsid maturation and stabilization following genome packaging of human cytomegalovirus and herpesviruses.

Muller C., Alain S., Gourin C., Baumert T.F., Ligat G., Hantz S. (2021). New insights into human cytomegalovirus pUL52 structure.

Muller C., Tilloy V., Frobert E., Feghoul L., Garrigue I., Lepiller Q., Mirand A., Sidorov E. Hantz S., Alain S. (2022). First clinical description of letermovir resistance mutation in cytomegalovirus *UL51* gene and potential impact on the terminase complex structure.

Coste-Mazeau P., Jacquet C., Muller C., Courant M., El-Hamel C., Chianea T., Hantz S., Alain S. (2022). Potential of anti-CMV Immunoglobulin Cytotect CP® *in vitro* and *ex vivo* in a first-trimester placenta model.

Article en préparation :

Muller C., Alain S., Hantz S. (2022). Structure prediction and mutagenesis reveal essential Leucine Zipper motif in pUL51 for Human cytomegalovirus replication.

Communications :

Communication affichées soumises à comité de lecture nationale et internationale :

Muller C., Ligat G., Alain S., Hantz S. (avril 2021). New insights in pUL52, a fourth component of the HCMV terminase complex. XXIII^{es} Journées Francophones de Virologie. Poster N° 126.

Muller C., Ligat G., Alain S., Hantz S. (juin 2021). La protéine pUL52, nouvelle cible thérapeutique contre le cytomegalovirus humain. Journée de l'interdisciplinarité (JEDI), Limoges, France.

Muller C., Ligat G., Alain S., Hantz S. (juillet 2021). pUL52: a new potential therapeutic target of human cytomegalovirus DNA-packaging. 31st European Congress of Clinical Microbiology & Infectious Diseases (ECCMID). Poster N° 02982.

Muller C., Tilloy V., Sidorov E., Feghoul L., Frobert E., Garrigue I., Lepiller Q., Mirand A., Feuillet-Soummer S., Dekeyser M., Hantz S., Alain S. (mars 2022). First description of letermovir resistance mutation in *UL51* gene from a HSCT-patient and study of its impact on the terminase complex structure. 8th international Congenital CMV Conference & 18th International CMV workshop. Poster N° 2.04

Muller C., Ligat G., Alain S., Hantz S. (avril 2022). pUL52: a new potential therapeutic target of human cytomegalovirus DNA-packaging. 32st European Congress of Clinical Microbiology & Infectious Diseases (ECCMID). Lisbonne, Portugal. Poster N° P0052

Communication orale soumise à comité de lecture internationale :

Muller C., Tilloy V., Sidorov E., Feghoul L., Frobert E., Garrigue I., Lepiller Q., Mirand A., Feuillet-Soummer S., Dekeyser M., Hantz S., Alain S. (mars 2022). First description of letermovir resistance mutation in *UL51* gene from a HSCT-patient and study of its impact on the terminase complex structure. 8th international Congenital CMV Conference & 18th International CMV workshop. Oral communication O.36.

Encadrements :

Mars – Avril 2021 : **Claire Gourin**, Master 1 Santé Publique, Université de Limoges

« *Étude du polymorphisme de la protéine pUL52 du complexe d'encapsidation du cytomégalovirus humain* »

Mai – Juin 2021 : **Audrey Viargues**, Master 1 Biologie Santé, Université de Limoges

« *Caractérisation de mutations de la protéine pUL52 du cytomégalovirus humain chez des patients traités par le letermovir* »

Formations suivies :

Depuis 2016, des formations sont proposées aux doctorants par l'École Doctorale. Mise à part la formation obligatoire « *Introduction à l'éthique de la recherche et à l'intégrité scientifique* » de 4 h, le choix des autres formations est libre. Ainsi au cours de ma thèse j'ai décidé de suivre les formations suivantes ;

Management et animation d'équipe. Formation effectuée par l'entreprise « V2 Management Solutions » sur une durée de 14 h. Janvier 2020.

Outils numériques pour la recherche documentaire et rédaction de la thèse. Formation encadrée par l'université de Limoges d'une durée de 3 h. Janvier 2021.

Expression et communication orale en anglais. 2 h par semaine pendant 6 semaines. Cours encadrés par Christine Poiraudéau. Avril 2021.

Prise de parole en public. Animé par Christophe Barget sur une durée de 7 h. Cette formation est un prérequis pour l'inscription au concours « ma thèse en 180 secondes » ou MT180S. Décembre 2021

Préparation au concours MT180S. Accompagnement par Christophe Barget et les membres de l'École doctorale pour la présentation au concours. **Premier prix local** et participation à la sélection régionale à Poitiers. Édition 2022.

JEDI « Journée d'Échanges des Doctorants de l'université de Limoges autour de l'Interdisciplinarité ». École d'été, sur une durée de 3 jours. Événement organisé par les associations de Doctorants de l'Université de Limoges. Présentation en équipe d'un projet interdisciplinaire face à un jury avec l'obtention du **premier prix** de l'édition 2021 et du **deuxième prix** de l'édition 2022.

TABLE DES MATIÈRES

PRÉAMBULE.....	25
ÉTUDE BIBLIOGRAPHIQUE.....	27
I. L'infection à CMVH.....	28
I.1. Épidémiologie.....	28
I.2. Transmission et physiopathologie.....	29
I.3. Infection chez le patient immunodéprimé.....	30
I.4. Infection congénitale.....	33
I.5. Diagnostic.....	34
Diagnostic indirect.....	34
Diagnostic direct.....	35
II. Le cytomégalovirus humain.....	37
II.1. Classification.....	37
II.2. Structure du virus et du génome.....	38
II.3. La réplication virale.....	43
III. Traitements de l'infection à CMVH.....	48
III.1. Les inhibiteurs de la polymérase virale pUL54.....	49
III.2. L'inhibiteur de la kinase virale pUL97.....	52
III.3. Les inhibiteurs du complexe terminase.....	53
III.4. Les immunoglobulines.....	57
IV. Stratégies thérapeutiques.....	60
V. Non-réponse au traitement et résistance.....	62
V.1. Définitions.....	62
V.1. Gènes et mutations de résistance.....	64
V.2. Détection de la résistance.....	67
VI. Les protéines impliquées dans l'encapsidation de l'ADN viral, une cible d'intérêt pour le développement de nouveaux antiviraux.....	70
VI.1. Les protéines du complexe terminase.....	71
La protéine pUL56.....	71
La protéine pUL89.....	74
La protéine pUL51.....	77
VI.2. Les protéines partenaires.....	78
La protéine pUL52.....	78
Les protéines pUL77 et pUL93.....	79
VI.3. Mécanisme d'encapsidation chez les herpèsvirus.....	80
OBJECTIFS DE L'ÉTUDE.....	84
ÉTUDE EXPERIMENTALE.....	86
PARTIE 1 : Implication de la protéine pUL51 dans la résistance au letermovir.....	88
Article 1.....	90
PARTIE 2 : Identification de nouvelles cibles thérapeutiques en vue du développement de thérapies anti-CMVH.....	106
A – Étude de la protéine pUL51, identification d'un motif Leucine Zipper.....	108
Article 2.....	110

Travaux complémentaires : Validation de la cible thérapeutique par le développement d'un peptide inhibiteur	122
B – Étude de la protéine pUL52.....	128
Article 3	130
Travaux complémentaires : implication de pUL52 dans le mécanisme d'action du letermovir ?.....	152
PARTIE 3 : Production des protéines pUL56 et pUL89	156
3.1. Objectifs	156
3.2. Production des protéines pUL89 et pUL56 : état des lieux	158
3.3. Expériences de production par baculovirus en cellules d'insectes	160
3.4. Matériels et méthodes	164
3.4.1 Cellules et infection	164
3.4.2 Constructions plasmidiques	164
3.4.3 Obtention des baculovirus recombinants AcMNPV [UL56] et AcSLP10 [UL89]	165
3.4.4 Lyse cellulaire et purification des protéines pUL56 ou pUL89	167
3.4.5 Méthodes d'analyse et de détection des protéines	167
3.5 Résultats	170
3.5.1. Amplification des inserts et sous-clonage	170
3.5.2. Validation des vecteurs de transferts recombinants pGmAc116t [UL56] et p119 [UL89].....	171
3.5.3. Obtention des baculovirus recombinants	172
3.5.4. Production et purification de la protéine recombinante pUL89	175
CONCLUSIONS ET PERSPECTIVES	182
Mécanisme d'action du letermovir.....	182
Identification et validation de cibles thérapeutiques	184
Études des protéines pUL56 et pUL89	188
CONCLUSION GÉNÉRALE	194
RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES.....	196
ANNEXES.....	206

TABLE DES ILLUSTRATIONS

Figure 1 : Estimation des séroprévalences mondiales du CMVH chez les femmes en âge de procréer.....	28
Figure 2 : Représentation artistique du CMV congénital.	32
Figure 3 : Isolement du CMVH en culture virale (A) et aspect caractéristique en œil de hibou d'une cellule infectée par le CMVH (B).	35
Figure 4 : Structure du virion CMVH.	38
Figure 5 : Reconstitution atomique par CryoEM de la capsidite du CMVH.	40
Figure 6 : Du génome au site de clivage.	41
Figure 7 : Expression et fonctions des gènes viraux lors du cycle de réplication viral.	42
Figure 8 : Cycle viral du CMVH.....	43
Figure 9 : Liaison des glycoprotéines d'enveloppe du CMVH au(x) récepteur(s) de la cellule hôte.	44
Figure 10 : Observation des capsides A, B et C du CMVH au microscope électronique.	46
Figure 11 : Capsidite et encapsidation.	47
Figure 12 : Structures chimiques des molécules antivirales ciblant la polymérase virale et leurs analogues.....	48
Figure 13 : Mécanisme d'action des principaux antiviraux contre le CMVH.	51
Figure 14 : Essais effectués pour évaluer l'effet du Cytotect CP®.	58
Figure 15 : Cinétique de l'émergence de souches résistantes.	63
Figure 16 : Mutations de résistance dans la protéine pUL54.	64
Figure 17 : Mutations de résistance dans la protéine pUL97.	65
Figure 18 : Mutations de résistance dans les protéines pUL56, pUL89 et pUL51.....	66
Figure 19 : Construction d'un virus recombinant par la méthode des BAC.	68
Figure 20 : Régions variables et conservées de la protéine pUL56 du complexe terminase du CMVH.	73
Figure 21 : Structure de pUL89.....	76
Figure 22 : Structure atomique du complexe terminase de l'HSV-1.....	81
Figure 23 : Mode d'action théorique d'un peptide homologue à un domaine essentiel pour la réplication virale.....	122
Figure 24 : Séquence peptidique et structure de TAT-HK29.....	124
Figure 25 : Évaluation de la toxicité (A) et de l'efficacité (B) du peptide TAT-HK29.....	125
Figure 26 : Observation microscopique du peptide TAT-HK29 dilué ou non dans du milieu de culture.	126
Figure 27 : Analyse des courbes de croissances des 6 virus recombinants pUL52.....	153

Figure 28 : Structure tridimensionnelle du complexe terminase de HSV-1 incluant les mutations de résistance au letermovir.	157
Figure 29 : Schéma d'un test d'interaction protéine-protéine avec la technologie ALPHA..	157
Figure 30 : Représentation schématique de l'obtention d'un virus recombinant par recombinaison homologue.....	161
Figure 31 : Organigramme, du design des inserts à la construction des baculovirus recombinants, pour la production de protéines pUL56 et pUL89.	163
Figure 32 : Isolement d'un baculovirus recombinant par la méthode des plages de lyse. ..	166
Figure 33 : Amplification des inserts UL56 et UL89 et validation du sous-clonage.	170
Figure 34 : Amplification des inserts UL56 et UL89 par PCR de criblage sur colonie.	171
Figure 35 : Observation microscopique des plages de lyses après transfection.	173
Figure 36 : Validation de l'obtention des baculovirus recombinants par PCR sur Hirt.	174
Figure 37 : Validation de la présence de pUL89 dans le lysat de cellules <i>Sf9</i> infectées.	176
Figure 38 : Purification sur billes de la protéine pUL89 après différentes méthodes de lyse.	177
Figure 39 : Purification des protéines pUL89 et analyse de pUL89 par spectrométrie de masse.	178
Figure 40 : Purification des protéines pUL56 et pUL89 à partir de lysats infectés AcMNPV [UL56] ou co-infectés AcMNPV [UL56] et AcSLP10 [UL89].	180

TABLE DES TABLEAUX

Tableau 1 : Symptômes et complications des infections à CMVH chez les personnes immunocompétentes, immunodéprimées et chez les nouveau-nés.	29
Tableau 2 : Interprétation du diagnostic sérologique.	34
Tableau 3 : Classification des herpèsvirus humains pathogènes chez l'homme.	37
Tableau 4 : Aperçu des inhibiteurs de l'étape d'encapsidation du CMVH.	54
Tableau 5 : Traitements et prévention de l'infection à CMVH.	61
Tableau 6 : Gènes impliqués dans l'encapsidation de l'ADN viral chez les herpèsvirus.	70
Tableau 7 : Génotypes et phénotypes des virus recombinants.	88
Tableau 8 : Concentrations efficaces inhibant 50 % de la croissance virale (EC50) pour les 6 virus recombinants.	152
Tableau 9 : Informations relatives aux protéines pUL56 et pUL89 du CMVH.	159
Tableau 10 : Caractéristiques des échantillons cliniques.	182

ABRÉVIATIONS ET SIGLES

Å	Angström
aa	Acide aminé
AAC	Autorisation d'accès compassionnel
ACV	Aciclovir
ADN	Acide desoxyribo-nucléique
ALPHA	<i>Amplified luminescent proximity homogeneous assay</i>
AMM	Autorisation de mise sur le marché
ATP	Adénosine triphosphate
ATU	Autorisation temporaire d'utilisation
BAC	<i>Bacterial Artificial Chromosome</i> , chromosome bactérien artificiel
BDCRB	2-bromo-5,6-dichloro-1-(β -D-ribofuranosyl) benzimidazole
BlastP	<i>Basic local alignment search tool for Protein</i>
CD4+	Lymphocyte T CD4+
CDV	Cidofovir
Cl₄RB	4,5,6-tetrachloro-1-(2,3,5-tri-O-acetyl- β -D-ribofuranosyl) benzimidazol
CMV	Cytomégalovirus
CMVH	Cytomégalovirus humain
CryoEM	<i>Cryo electron microscopy</i> , cryo-microscopie électronique
D-	Donneur séronégatif
D+	Donneur séropositif
Da	Dalton
DDA	Data dependent acquisition
DEL	Délétion
DN50	Dose de neutralisation 50%
DN90	Dose de neutralisation 90%
dNTP	Désoxyribonucléotide triphosphate
DTT	Dithiothréitol
EBV	Virus Epstein-Barr
EC50	<i>50% effective concentration</i>
EC90	<i>90% effective concentration</i>
ECP	Effet cytopathique
ELISA	<i>Enzyme-Linked immunosorbent Assay</i>
For	<i>Forward</i> , amorce sens
FOS	Foscarnet
g	<i>Force relative centrifuge</i>
gB	Glycoprotéine B
GCV	Gancyclovir
HA	Hémagglutinine
HIG	Hyper Immunoglobuline
HIS	Histidine
HPLC	<i>High performance liquid chromatography</i>

HRP	<i>horseradish peroxidase</i> , peroxydase de raifort
HSV	Herpès simplex virus
ICP 18.5	<i>Infected cell protein 18.5</i>
IDR	<i>Intrinsically disordered regions</i> , Régions intrinsèquement désordonnées
IgG, IgM	Immunoglobulines de type G, de type M
IRL	<i>Internal repeat long</i>
IRS	<i>Internal repeat short</i>
IS	Index de sensibilité
IVG	Interruption volontaire de grossesse
IVIG	<i>Intravenous immunoglobulin</i> , immunoglobuline intraveineuse
Kb	Kilo paire de bases
KSHV	Herpèsvirus lié au Kaposi
LCR	Liquide céphalo-rachidien
LTV	Letermovir
LZ	<i>Leucine zipper</i>
MBV	Maribavir
MCP	<i>Major capid protein</i> , protéine majeure de capsid
Mn²⁺	Magnésium
MOI	<i>Multiplicity of infection</i> , multiplicité d'infection
MRC-5	Fibroblastes diploïdes issus de poumons d'embryons foétaux humains
MS	<i>Mass spectrometry</i> , spectrométrie de masse
MT	Marqueur de taille
MW	<i>Molecular weight</i> , masse moléculaire
NaCl	Chlorure de sodium
NaH₂PO₄	Dihydrogénophosphate de sodium
NGS	<i>Next generation sequencing</i>
NLS	<i>Nuclear localisation signal</i> , signal de localisation nucléaire
Ob-	<i>Oclusion body negative</i> , absence de corps d'occlusion
Ob+	<i>Oclusion body positif</i> , présence de corps d'occlusion
ORF	<i>Open reading frame</i> , cadre ouvert de lecture
P10	Promoteur 10
pac	<i>cis-acting packaging element</i>
pb	Paire de bases
PBS	<i>Phosphate-buffered saline</i> , tampon phosphate salin
PCR	<i>Polymerase chain reaction</i> , réaction en chaîne de la polymérase
PDB	<i>Protein Data Bank</i> , Banque de données protéiques
Pe	Polyédrine
pp	Protéine phosphorilée
ppi	Pyrophosphate
PVDF	Polyvinylidene Fluoride
qPCR	Quantitative Polymerase Chain Reaction
R-	Receveur séronégatif
R+	Receveur séropositif
RMSD	<i>Root-Mean-Square Deviation</i> , déviation de la racine de la moyenne des carrés

RPE-1	<i>Retinal Pigment Epithelial</i>
SCP	<i>Small capsid protein</i> , petite protéine de la capside
SDS-PAGE	<i>Sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis</i>
SIDA	Syndrôme d'immunodéficience acquise
T+	Témoin positif
TBS	<i>Tris-buffered saline</i> , solution saline tamponnée Tris
TCRB	2,5,6-trichloro-1-(β -D-ribofuranosyl)benzimidazole
TEV	Site de reconnaissance de la protéase TEV du virus du tabac
TFA	Acide trifluoroacétique
TRL	<i>Terminal repeat long</i>
TRS	<i>Terminal repeat small</i>
UL	Segment unique long
US	Segment unique court
v/v	Volume à volume
VACV	Valaciclovir
VGCV	Valgancyclovir
VIH	Virus de l'immunodéficience humaine
VZV	Virus varicelle-zona
WB	<i>Western blot</i>
WT	<i>Wild type</i>
Zf	<i>Zinc finger</i> , motif protéique en doigt de zinc



« Pour comprendre ce que je fais, voyez plutôt le virus comme un vaisseau spatial à la conquête de nouvelles planètes... Lorsque qu'un vaisseau spatial prend pour cible une planète, c'est pour y détourner toutes ses ressources afin de composer une nouvelle armée de vaisseaux et d'envahir d'autres planètes. » - **Extrait MT180S Clotilde Muller.**

Crédit dessin : Clotilde Muller

PRÉAMBULE

Les virus, ces entités à la frontière du vivant fascinent la communauté scientifique depuis de nombreuses années. L'estimation de leur nombre est de 10^{31} , soit plus d'un quintillion ! Invisibles à l'œil nu, ils sont pourtant partout ; aussi bien dans l'eau, dans l'air, dans la terre qu'en nous ("Microbiology by numbers," 2011).

Pour l'Homme, 200 sont recensés comme des pathogènes entraînant des maladies bénignes, des maladies graves ou même comme étant impliqués dans les cancers (Viral Zone, 2022).

Parmi ces virus, on retrouve le cytomégalovirus (CMV) : je l'ai étudié non parce qu'il porte mes initiales, mais plutôt dans le but de le **comprendre** lui et son fascinant mécanisme d'encapsidation pour de **mieux le contrer**.

La découverte de ce virus se situe vers la fin du XIX^{iem} siècle où de premières inclusions cytoplasmiques et nucléaires sont observées dans des coupes de rein d'enfants mort-nés. Son nom trouve ces origines dans ces observations. Ce n'est que dans les années 50 que le cytomégalovirus humain fut isolé en culture cellulaire (Ho, 2008). Depuis, les connaissances relatives au cytomégalovirus humain se sont accrues, mais demeurent encore incomplètes.

Le cytomégalovirus appartient à famille des herpèsvirus comportant près de 120 membres dont les plus connus du grand public restent l'herpès simplex (HSV), le virus de la varicelle et du zona (VZV) ou encore le virus d'Epstein Barr (EBV) responsable de la mononucléose infectieuse. Ubiquitaire, le CMV infecte près de 50 % de la population française et se transmet par des contacts étroits *via* les fluides et sécrétions corporels d'individus infectés. Son pouvoir pathogène, le plus souvent discret, est sous-estimé. En effet, si la plupart des premières rencontres avec le virus sont inapparentes chez les personnes immunocompétentes, sa persistance dans l'organisme (latence) et son implication dans de nombreux mécanismes cellulaires en font un **redoutable pathogène** chez les patients **immunodéficients, receveurs de greffe** ou encore les personnes **atteintes du syndrome d'immunodéficience acquise** (SIDA). L'infection à CMV peut entraîner chez ces patients une maladie à CMV avec des atteintes au niveau des organes vitaux. Par ailleurs, le CMV constitue la **principale cause d'infection congénitale d'origine virale**. Malgré l'efficacité des traitements développés, leur toxicité et l'émergence de résistances entraînent des défis thérapeutiques. Il est donc primordial d'étudier ce virus pour pouvoir développer de nouvelles molécules antivirales.

Le challenge de ma thèse est de mieux comprendre le mécanisme d'encapsidation de l'ADN viral ce qui permettrait *in fine* le développement d'inhibiteurs anti-CMV spécifiques.

L'étape d'encapsidation est essentielle à la réplication du cytomégalovirus. Cette étape, très conservée chez les herpèsvirus et plus largement chez les bactériophages (Baker et al., 2005), consiste au conditionnement de l'information génétique (ADN) dans une structure protéique formant une capsid. Ce conditionnement est exercé par un ensemble de protéines dont un complexe protéique nommé « **terminase** ». Trois protéines correspondent au cœur de ce complexe (pUL56, pUL89, pUL51) et 3 autres protéines y participent sans que leur rôle soit encore bien défini (pUL52, pUL77, pUL93).

Dans ce manuscrit de thèse, après une étude bibliographique, seront présentés les différents résultats issus d'études bio-informatiques, d'homologie structurale, de biologie moléculaire et cellulaire.

La première partie se consacre à l'étude de l'implication d'une protéine du complexe terminase (pUL51) dans la résistance au traitement (letermovir).

La deuxième porte sur la relation structure-fonction de deux protéines impliquées dans le mécanisme d'encapsidation (pUL51 et pUL52).

Enfin une dernière partie porte sur la mise en place de la production des protéines pUL89 et pUL56 du complexe terminase pour étudier leurs interactions en présence ou non de molécules thérapeutiques (ex. letermovir).

ÉTUDE BIBLIOGRAPHIQUE

I. L'infection à CMVH

I.1. Épidémiologie

L'infection par le cytomégalovirus humain (CMVH) est de nature endémique plutôt qu'épidémique et ne semble pas être soumise à une influence saisonnière. Le CMVH infecte une large proportion de la population, et ce dès le plus jeune âge. Quarante à cent pour cent de la population mondiale est séropositive vis-à-vis du CMVH, ces estimations varient en fonction des pays et du statut socio-économique des individus (Cannon et al., 2010). La Chine, l'Amérique Latine et les pays des régions de l'Est de la Méditerranée et de l'Afrique ont la plus forte séroprévalence (90 %). Des données disponibles chez les femmes en âge de procréer illustrent les différences de la séroprévalence dans le monde (Zuhair et al., 2019) (**Figure 1**).

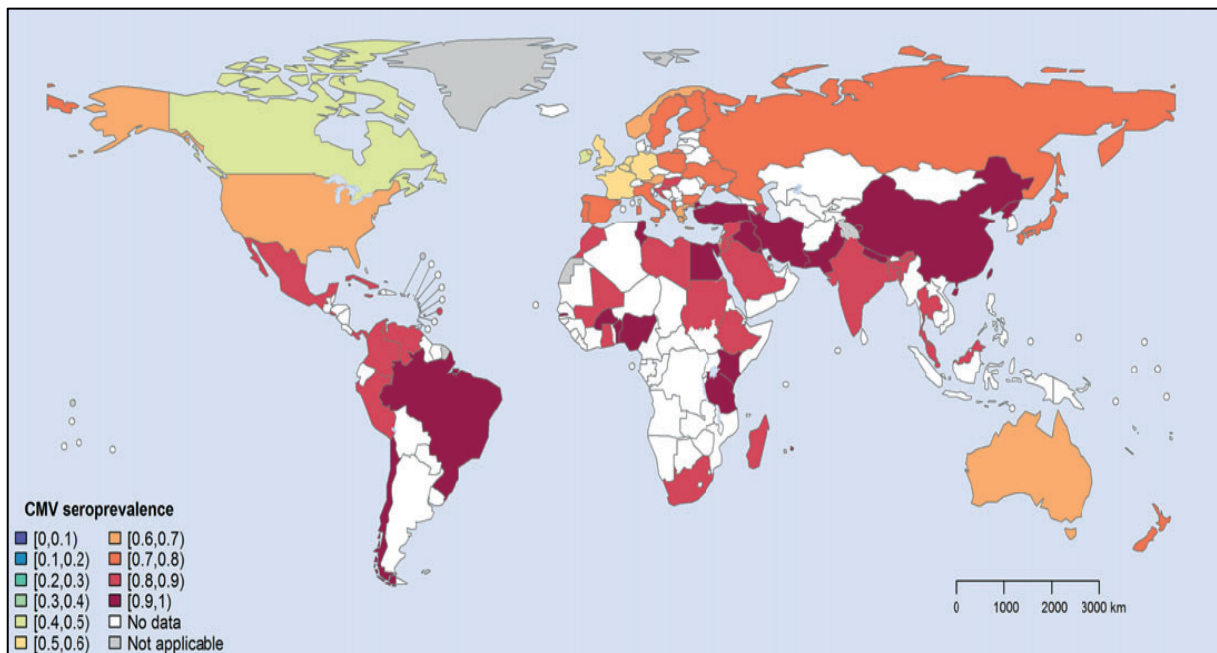


Figure 1 : Estimation des séroprévalences mondiales du CMVH chez les femmes en âge de procréer. (Zuhair et al., 2019)

I.2. Transmission et physiopathologie

Fragile dans le milieu extérieur, le CMVH se transmet par contact direct ou indirect, de manière verticale ou horizontale par échange de fluides ou de sécrétions biologiques telles que la salive, le sang, l'urine, les sécrétions génitales, ou encore le lait maternel et les larmes (Plosa et al., 2012). Les jeunes enfants infectés peuvent sécréter le virus pendant de longues périodes et sont donc une source commune d'infection (Plosa et al., 2012). Des cas d'infection à CMVH sont également décrits après transplantation d'organes ou encore des greffes de tissus (Nedeljković et al., 1984).

Tableau 1 : Symptômes et complications des infections à CMVH chez les personnes immunocompétentes, immunodéprimées et chez les nouveau-nés.

Individus	Signes et symptômes majeurs	Complications
Immunocompétent	Fatigue, fièvre, maux de gorge, douleurs musculaires	Atteintes du système digestif, du foie, du cerveau et du système nerveux
Immunodéprimé	Atteintes oculaire, pulmonaire, hépatique, digestive et cérébrale	Perte de la vue, pneumonie, colite, gastrite, œsophagite, hépatite, encéphalite, myélite,
Nouveau-né	Naissance prématurée, faible poids à la naissance, jaunisse, hypertrophie et dysfonctionnement hépatique, éruptions cutanées, microcéphalie, hypertrophie de la rate	Perte auditive, déficience intellectuelle et visuelle, crises d'épilepsie, manque de coordination, faiblesse musculaire

Adapté de Chen et al., 2019

Après contamination, le CMVH dissémine dans tout l'organisme grâce à son large tropisme lui permettant d'atteindre à la fois des tissus (cellules endothéliales, épithéliales ou encore fibroblastes) et des cellules circulantes (monocytes et macrophages) où il pourra établir son état de latence. Ce large tropisme explique la diversité des signes cliniques rencontrés.

L'infection primaire ou primo-infection à CMVH, est la première rencontre d'un individu avec le virus. Bien qu'une infection à CMVH soit très souvent asymptomatique, elle peut entraîner un syndrome mononucléosique (forme symptomatique la plus courante) et plus rarement des manifestations de type arthralgie, pneumopathie, méningite.

L'infection à CMVH se définit par la preuve d'une réplication virale par un diagnostic biologique indépendamment des symptômes (isolement du virus, détection de protéines virales ou d'acides nucléiques).

La maladie à CMVH se définit par la preuve d'une infection à CMVH avec des symptômes attribuables. La maladie à CMVH peut être classée en tant que syndrome CMVH (fièvre, malaise, leucopénie et/ou thrombocytopénie) ou en tant que maladie invasive tissulaire (atteinte d'organes) (Kotton et al., 2018; Ljungman, 2017).

À la suite d'une primo-infection, le CMVH, comme tous les autres herpèsvirus, persiste à l'état de latence dans de nombreux types cellulaires (cellules endothéliales, cellules souches hématopoïétiques, lymphocytes, monocytes,...) et peut se réactiver.

Il peut également provoquer de graves complications chez les personnes immunodéprimées où il agit comme un pathogène opportuniste. Les infections primaires, secondaires ou les réactivations peuvent induire une réplication virale dans la majorité des organes et ainsi entraîner des complications associées à des niveaux élevés de morbidité et de mortalité ; fièvre, pneumonie, rétinite, myélite, hépatite et autres problèmes neurologiques et gastro-intestinaux (**Tableau 1**) (Azevedo et al., 2015; Deayton et al., 2004; Emery, 2001; Lee et al., 2017; Pillet et al., 2012). De plus, la transmission verticale du CMVH peut entraîner des complications chez le nouveau-né le classant comme la première cause de malformations congénitales d'origine virale (**Tableau 1**).

Outre la réduction de la qualité et de la durée de vie des personnes avec des infections sévères, le CMVH représente un coût financier important pour le système de santé, tant pour le traitement des conséquences à long terme des malformations congénitales causées par le CMVH que pour l'évolution de la maladie chez les patients immunodéprimés.

I.3. Infection chez le patient immunodéprimé

L'équilibre entre latence et réactivation dépend en partie du statut immunitaire du sujet infecté. Le CMVH peut persister à l'état latent pendant de nombreuses années, cependant, en cas d'immunodépression et de stimulation antigénique d'origine infectieuse et/ou de stimulation allogénique (transfusion, greffon), des réactivations peuvent survenir et être à l'origine d'une nouvelle virémie (Sénéchal, 1998). La réactivation ou la primo-infection à CMVH chez ces patients peut se manifester par une réplication virale sans symptômes apparents ou par une maladie à CMVH se traduisant par une atteinte sévère des organes (**Tableau 1**) (Ljungman, 2017).

Le CMVH représente l'agent pathogène le plus souvent rencontré en transplantation. En effet 50 à 70 % des patients présentent une primo-infection ou une réactivation dans l'année qui suit la greffe (Pereyra and Rubin, 2004; Rubin, 2000). Deux types de transplantation sont à différencier, la transplantation d'un organe solide (rein, poumon, cœur...)

et l'allogreffe de cellules souches hématopoïétiques. Dans tous les cas, l'élément transplanté provenant d'un donneur séropositif peut contenir du virus à l'état latent et se répliquer chez le receveur séronégatif (**D+/R-**) ou séropositif (**D+/R+**).

Dans le cadre de la **transplantation d'organe solide**, le taux d'infection le plus élevé survient dans la combinaison **D+/R-** avec un risque d'infection d'environ 50 à 65 % (Pereyra and Rubin, 2004). Dans la configuration **D+/R+**, le receveur peut présenter une réinfection par une souche provenant du greffon d'un donneur (**D+**). La réinfection, plutôt rare, est moins sévère qu'une primo-infection du receveur (Pereyra and Rubin, 2004). Ainsi les configurations **D+/R+** et **D-/R+** constituent un risque d'infection relatif.

Dans le cadre de l'**allogreffe de cellules souches hématopoïétiques**, les patients séropositifs (**R+**) ont un taux de mortalité plus élevé que les patients séronégatifs (**R-**). Les facteurs de risque sont principalement liés à la réaction du greffon contre l'hôte, à la greffe provenant de donneurs non apparentés et à l'intensité du déficit immunitaire (Boeckh and Nichols, 2004; Robin et al., 2017).

Bien qu'à ce jour des traitements existent pour pallier les infections à CMV chez les patients transplantés, elles restent corrélées à une augmentation de la mortalité, de la morbidité ainsi qu'à une diminution de survie du greffon (Boeckh et al., 2015; Hodson et al., 2005).

Les patients infectés par le virus de l'immunodéficience humaine (VIH) sont dans la majorité des cas également séropositifs au CMV. La réactivation du CMV chez ces sujets est favorisée par l'état immunodépresseur qu'induit le VIH. Elle apparaît dans le cas où les lymphocytes T CD4+ sont inférieurs à 100/mm³ voire 50/mm³. Les manifestations cliniques sont variées et dépendent de l'organe atteint (rétinite, œsophagite, gastrite, entérocolite, neuropathie périphérique, encéphalite, hépatite, pneumonie). Avec l'évolution des traitements et notamment de la trithérapie antirétrovirale dans la fin des années 1990, l'incidence de la maladie à CMV a été diminuée de près de 80 % (Hantz and Boutolleau, 2019).



Figure 2 : Représentation artistique du CMV congénital.

Crédit dessin : Clotilde Muller

I.4. Infection congénitale

La revue « **Infection de la femme enceinte par le cytomégalo­virus : du dépistage au traitement** » détaille l'état des lieux sur l'infection congénitale (**Annexe 1**). Ce chapitre reprend les points essentiels de cette revue.

→ **Infection de la femme enceinte par le cytomégalo­virus : du dépistage au traitement**

*Perrine Coste-Mazeau, Sophie Alain, **Clotilde Muller**, Déborah Andouard, Sébastien Hantz*

L'infection de la femme enceinte par le CMVH peut entraîner des séquelles irréversibles pour l'enfant à naître. Ce virus est par ailleurs la première cause de handicap neurosensoriel d'origine infectieuse chez l'enfant avec une prévalence mondiale estimée à 0,65 % (Kenneson and Cannon, 2007; Leruez-Ville et al., 2017).

Les facteurs de risque d'une infection en cours de grossesse se sont relevés être en rapport avec le jeune âge maternel, l'emploi en relation avec la petite enfance et/ou le niveau socio-économique (Hyde et al., 2010). L'infection à CMVH (primo-infection/réinfection/réactivation) peut survenir tout au long de la grossesse et sa transmission s'effectue en passant par le placenta avec une réplication virale dans les cellules placentaires (fibroblastes, syncytiotrophoblastes, cytotrophoblastes). Le passage foetal n'est pas systématique : il est faible pour une réactivation/réinfection (0,15-3,4 %) et de l'ordre de 30 à 70 % pour une primo-infection selon le trimestre de grossesse. Bien que le risque de passage du virus au foetus augmente avec le terme de la grossesse, les atteintes sévères du foetus surviennent au cours du premier trimestre. Ainsi la primo-infection chez la femme enceinte durant le premier trimestre est la plus à risque pour le foetus (Chatzakis et al., 2020) (**Tableau 1**).

Environ 10 à 15 % des nourrissons atteints d'une infection congénitale risquent de présenter une infection symptomatique : retard mental, ictère, hépatosplénomégalie, microcéphalie, déficience auditive et/ou thrombocytopenie. Parmi ces séquelles, la plus sévère étant l'atteinte du système nerveux central car irréversible (Chen et al., 2019). Les nouveau-nés asymptomatiques atteints d'une infection à CMVH (environ 85 à 90 % des cas d'infection congénitale à CMVH) présentent néanmoins eux aussi un risque de séquelles à long terme, notamment de retard mental et de perte auditive neurosensorielle de l'ordre de 10 à 15 % des cas (Chen et al., 2019).

I.5. Diagnostic

Les outils de diagnostic de l'infection à CMVH sont nécessaires pour identifier d'une part le statut immunitaire du sujet vis-à-vis du pathogène et d'autre part pour évaluer la charge virale du CMVH afin d'assurer la surveillance du risque infectieux et l'efficacité thérapeutique. Différentes techniques de diagnostic ont été développées. Elles reposent sur des méthodes de détection indirecte et directe.

Diagnostic indirect

Le diagnostic indirect porte sur la recherche d'anticorps dirigés contre le CMVH dans le sérum d'un patient. Son objectif est d'identifier le statut immunitaire du patient. Il permet également de déterminer si l'infection est ancienne ou récente. Le test principalement utilisé est un test immunoenzymatique de type *Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay* (ELISA) et permet la détection d'anticorps totaux ou la différenciation des isotypes IgG et IgM.

Le **tableau 2** schématise les différentes situations du diagnostic sérologique. Alors que la présence d'immunoglobulines de type G (IgG) est spécifique d'une infection à CMVH, les immunoglobulines de type M (IgM) sont présentes lors d'une primo-infection, et fréquemment lors d'une réinfection ou d'une réactivation. Ainsi, il existe des situations dans lesquelles des IgM et des IgG sont détectées chez un sujet sans que l'on puisse déterminer avec certitude s'il s'agit d'une primo-infection. Lorsque le diagnostic de primo-infection est indispensable (chez la femme enceinte), la mesure de l'avidité des IgG doit être effectuée. L'avidité des IgG évalue la force de liaison entre les IgG et les antigènes. Elle augmente progressivement au cours des mois post-primo-infection ainsi plus l'avidité sera faible, plus le diagnostic sera en faveur d'une primo-infection.

Tableau 2 : Interprétation du diagnostic sérologique.

IgG	IgM	Interprétation	Analyses supplémentaires
Négatif	Négatif	Séronégatif : pas de contact avec le virus	/
Positif	Négatif	Séropositif : contact ancien avec le virus	/
Négatif	Positif	Primo-infection probable	Contrôle sérologique et/ou PCR
Positif	Positif	Primo-infection ou réactivation ou réinfection	Avidité

Adapté de Coste-Mazeau et al., 2021

Diagnostic direct

Le diagnostic direct repose sur la mise en évidence du CMVH ou une partie de celui-ci (génom, antigène). Différentes techniques peuvent être employées ;

L'isolement viral est la technique historique. Elle consiste en l'inoculation des prélèvements sur des fibroblastes embryonnaires humains de poumon (cellules MRC-5) jusqu'à l'observation d'effet cytopathique (ECP). Un ECP est constitué de foyers infectieux dont l'extension suit le grand axe des fibroblastes, ces derniers augmentant de volume et devenant réfringents. L'aspect caractéristique des foyers infectieux *in vitro* est classiquement décrit en « banc de poissons » (**Figure 3, A**). La durée de l'isolement étant long (apparition d'ECP entre 8 et 20 jours), cette technique n'est plus utilisée en clinique et laisse place à d'autres méthodes plus rapides.

Les examens **cytologique et/ou histologique** consistent à l'analyse de l'aspect des cellules issues d'un prélèvement biologique (biopsies, frottis, liquides,...) en microscopie après fixation et coloration. L'aspect caractéristique des cellules infectées *in vivo* est « l'inclusion en œil de hibou » (**Figure 3, B**). Les cellules apparaissent de grande taille et possèdent des inclusions intranucléaires et intra-cytoplasmiques. Les coupes histologiques permettent également la détection de protéines virales à l'aide d'anticorps spécifiques (immunohistochimie/immunofluorescence) (Pillet et al., 2014).

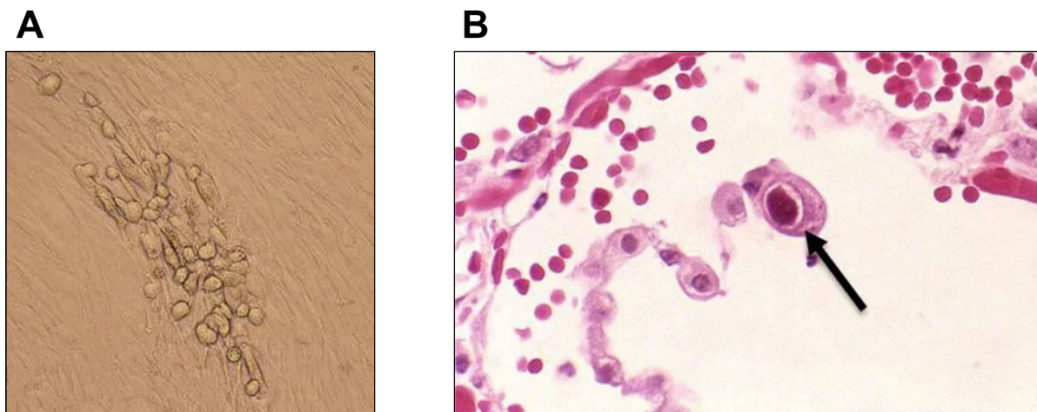


Figure 3 : Isolement du CMVH en culture virale (A) et aspect caractéristique en œil de hibou d'une cellule infectée par le CMVH (B).

A. Crédit photo : Pr Sébastien Hantz

B. CHU Limoges CDC Public Health Image Library. Crédit photo: CDC/Dr. Edwin P. Ewing, Jr. (PHIL #958), 1982.

Enfin, la méthode la plus employée est la **détection et la quantification de l'ADN viral** avec l'utilisation d'une gamme externe. Cette méthode, basée sur une PCR en temps réel (qPCR), permet une détection rapide et spécifique du CMVH dans différents types de prélèvements (urine, sang, biopsie, humeur aqueuse, liquide céphalo-rachidien (LCR)...). Le suivi de la charge virale par cette méthode chez un patient est essentiel pour adapter au mieux la stratégie thérapeutique (notamment chez les immunodéprimés). Cependant, pour un même échantillon, les résultats peuvent différer selon la méthode utilisée. Bien qu'il soit recommandé d'effectuer la surveillance d'un patient par le même laboratoire, les résultats sont exprimés en unité internationale (UI.mL⁻¹) pour pouvoir être comparés (Pillet et al., 2014).

II. Le cytomégalovirus humain

II.1. Classification

La famille des *Herpesviridae* est composée de virus enveloppés à ADN double brin dont huit membres ont l'homme comme hôte naturel. Elle est divisée en 3 sous-familles ; les **Alphaherpesvirinae** (herpès simplex virus de type 1 et 2, varicellovirus), les **Betaherpesvirinae** (cytomégalovirus humain, herpèsvirus humains de type 6 et type 7) et les **Gammaherpesvirinae** (virus d'Epstein Barr, herpèsvirus humain de type 8). Ces sous familles sont classées en fonction des propriétés morphologiques, biologiques et génomiques des virus (Tableau 3).

Tableau 3 : Classification des herpèsvirus humains pathogènes chez l'homme.

Sous-famille	Genre	Dénomination		Taille du génome (kb)
		Officielle	Usuelle	
<i>Alphaherpesvirinae</i>	<i>Simplex virus</i>	Herpèsvirus humain 1	Herpès Simplex type 1 (HSV-1)	152
		Herpèsvirus humain 2	Herpès Simplex type 2 (HSV-2)	152
	<i>Varicellovirus</i>	Herpèsvirus humain 3	Virus varicelle-zona (VZV)	125
<i>Betaherpesvirinae</i>	<i>Cytomegalovirus</i>	Herpèsvirus humain 5	Cytomégalovirus humain (CMV)	230
	<i>Roseolovirus</i>	Herpèsvirus Humain 6	HHV-6	160
		Herpèsvirus Humain 7	HHV-7	145
<i>Gammaherpesvirinae</i>	<i>Lymphocryptovirus</i>	Herpèsvirus humain 4	Virus Epstein-Barr (EBV)	172
	<i>Rhadinovirus</i>	Herpèsvirus Humain 8	Herpèsvirus lié au kaposi (KSHV)	170

D'après Mazon, 2002

II.2. Structure du virus et du génome

Une particule infectieuse de cytomégalovirus humain est de forme sphérique avec un diamètre mesurant près de 200 nm. Elle comprend quatre composants principaux ; l'enveloppe, le tégument, la capsidie icosaédrique et le génome viral (**Figure 4**). Chaque élément est abordé dans les paragraphes ci-après.

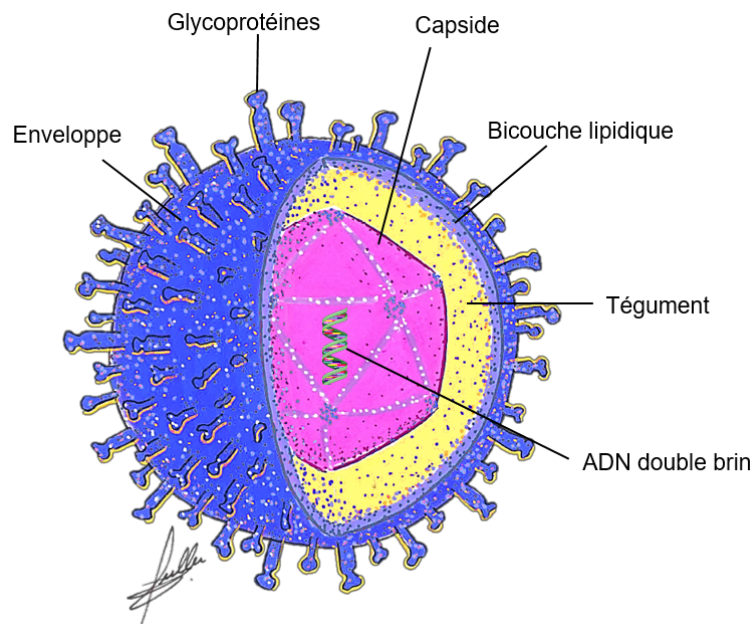


Figure 4 : Structure du virion CMVH.

Crédit dessin : Clotilde Muller

L'**enveloppe** externe est constituée d'une bicouche phospholipidique dérivée des membranes internes cytoplasmiques et nucléaires ce qui confère au virion une sensibilité à la chaleur, au pH et aux solvants. L'enveloppe porte également des protéines virales permettant la reconnaissance, l'entrée de la particule infectieuse dans une cellule cible ou encore l'infection de cellules à cellules. Ces protéines sont des glycoprotéines, dont les plus étudiées sont les gB, gH, gM/N, et gL (Britt and Boppana, 2004) (**Figure 4**).

Le **tégument** correspond à l'espace situé entre l'enveloppe et la capsid. Le tégument est défini comme une substance amorphe composée de protéines. Il est admis qu'elles représentent plus de la moitié des protéines totales présentes dans les virions infectieux (Kalejta, 2008). Ces protéines, une fois libérées dans le cytoplasme, deviennent fonctionnellement actives et jouent des rôles importants dans toutes les étapes du cycle viral (entrée, l'expression génétique, échappement au système immunitaire, assemblage de la capsid et sortie) (Kalejta, 2008). Les protéines tégumentaires à ce jour les plus étudiées sont les phosphoprotéines pp71, pp150 et pp28 (Tomtishen III, 2012) (**Figure 4**).

La **capsid** du CMVH est un icosaèdre avec une symétrie T=16 dont le diamètre externe est de 125-130 nm (Arvin and Arvin, 2007) (**Figure 4**). Elle est composée de 150 hexons qui constituent les 30 arrêtes et les 20 faces de l'icosaèdre, avec 11 pentons occupant 11 des 12 sommets et 320 triplex qui relient les pentons et les hexons entre eux. Les protéines formant une structure annulaire appelée « portail » occupent le douzième sommet (Muller et al., 2021a). Les hexons et pentons sont formés à partir de la protéine pUL86 aussi appelée MCP pour « **Major Capsid Protein** ». Les triplex sont composés de pUL85 formant un dimère et de pUL46 formant le monomère du complexe. Enfin les protéines pUL48a ou SCP pour « **Small Capsid Protein** » participent à la stabilisation de l'édifice en se fixant sur la pointe des hexons (**Figure 5**). pUL104 est une protéine s'assemblant en dodécamère pour former un portail sur le douzième sommet. Ce portail permet l'entrée de l'ADN dans la capsid néoformée. Deux autres protéines sont également impliquées dans la fabrication et la composition de la capsid ; les protéines pUL80 et pUL80.5. pUL80.5 est une protéine dite « **scaffold** » permettant l'assemblage de la capsid et pUL80 est une protéase participant à la maturation de la capsid en dégradant les protéines « **scaffold** » lors de l'encapsidation de l'ADN. L'implication des protéines portails et « **scaffold** » pour la réplication est décrite dans le paragraphe II.3.

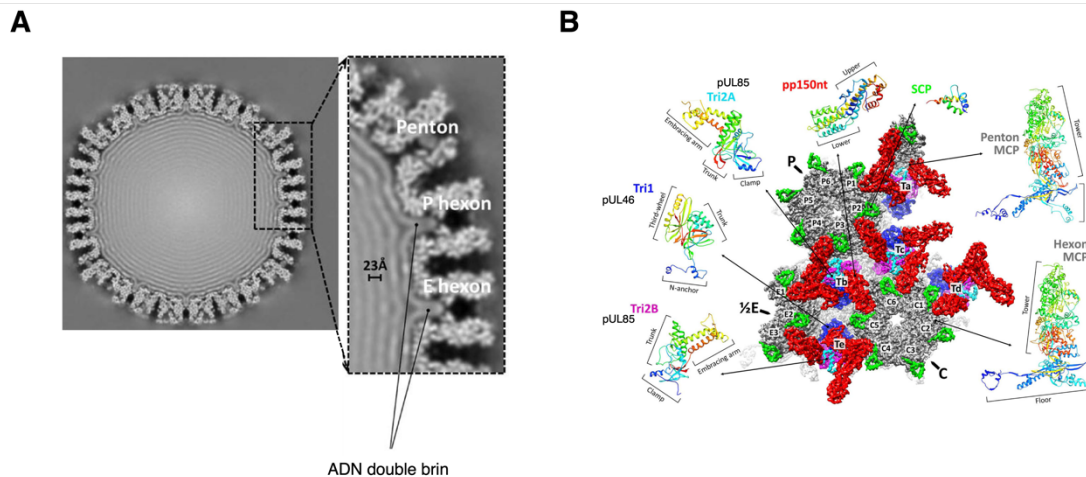


Figure 5 : Reconstitution atomique par CryoEM de la capside du CMVH.

A. Coupes centrales d'une reconstruction du virion CMVH à 15 Å. **B.** Une unité asymétrique colorée par type de sous-unité protéique, chacune des protéines est représentée individuellement en modèle ruban. Les MCPs (en gris) composent les pentons et les hexons. Les triplex sont des hétérotrimères composés de Tri1 (bleu) et d'un dimère Tri2A (cyan)-Tri2B (magenta). Les SCP (vert) se lient aux MCPs, tandis que les protéines tégmentaires pp150 (en rouge) se regroupent au-dessus des triplex. Adapté de Yu et al., 2017.

➔ Structures and Divergent Mechanisms in Capsid Maturation and Stabilization Following Genome Packaging of Human Cytomegalovirus and Herpesviruses

Clotilde Muller, Sophie Alain, Thomas Baumert, Gaëtan Ligat, and Sébastien Hantz

Les avancées en cryomicroscopie électronique (CryoEM) ont permis la résolution des structures tridimensionnelles des capsides entre les différents herpèsvirus (HSV-1 & 2, KSHV, EBV, VZV) (Liu et al., 2019; Sun et al., 2020; Yu et al., 2017) (**Figure 5**). Bien que les capsides soient similaires d'un point de vue structural, des différences subsistent entre les protéines les composants. Cette revue rédigée pendant ma thèse détaille les mécanismes mis en place lors de la phase de maturation de la capside et d'encapsidation de l'ADN viral chez les herpèsvirus (**Annexe 2**).

Le **génom**e du CMVH est constitué d'un ADN double brin comportant près de 230 000 paires de bases pour la souche AD169 (ATTC, VR-538™). Ce génome entièrement séquencé code près de 180 protéines dont 35 sont constitutives de la particule virale. Les autres protéines interviennent dans la réplication et dans les interactions avec le métabolisme cellulaire. Le génome du CMVH est le plus grand et le plus complexe de tous les génomes séquencés de la famille des *Herpesviridae* (**Tableau 3**). Sa structure se compose de deux segments uniques nommés « **segment unique long** » ou « **UL** » et « **segment unique court** »

ou « **US** » (**Figure 6**). Contrairement au segment UL contenant 132 cadres ouverts de lecture (ORF), le segment US en est composé de 34. Les ORFs sont numérotés à partir de l'extrémité 5' des segments génomiques qui les portent et leurs noms sont constitués du nom du segment suivi du numéro de l'ORF. Ainsi les gènes correspondant aux différents ORFs du segment unique long sont nommés UL1 à UL132 et ceux du segment unique court US1 à US34. À ces segments uniques sont flanqués des séquences inversées répétées appelées : **TRL** « *Terminal Repeat Long* » et **IRL** « *Internal Repeat Long* » ou **TRS** « *Terminal Repeat Short* » et **IRS** « *Internal Repeat Short* » suivant qu'il s'agisse de l'extrémité du segment long ou court. De plus, le génome contient à ses deux extrémités et entre les séquences **IRL** et **IRS** des séquences répétées désignées séquences « **a** » qui sont notamment impliquées dans le mécanisme d'encapsidation du génome viral (**Figure 6**). Ces séquences « **a** » contiennent des régions régulatrices nommées séquences « **pac** » ou « *cis-acting packaging element* » qui servent de site de reconnaissance pour le clivage des concatémères d'ADN produits lors de la réplication virale (Bogner et al., 1998) (**Figure 6**).

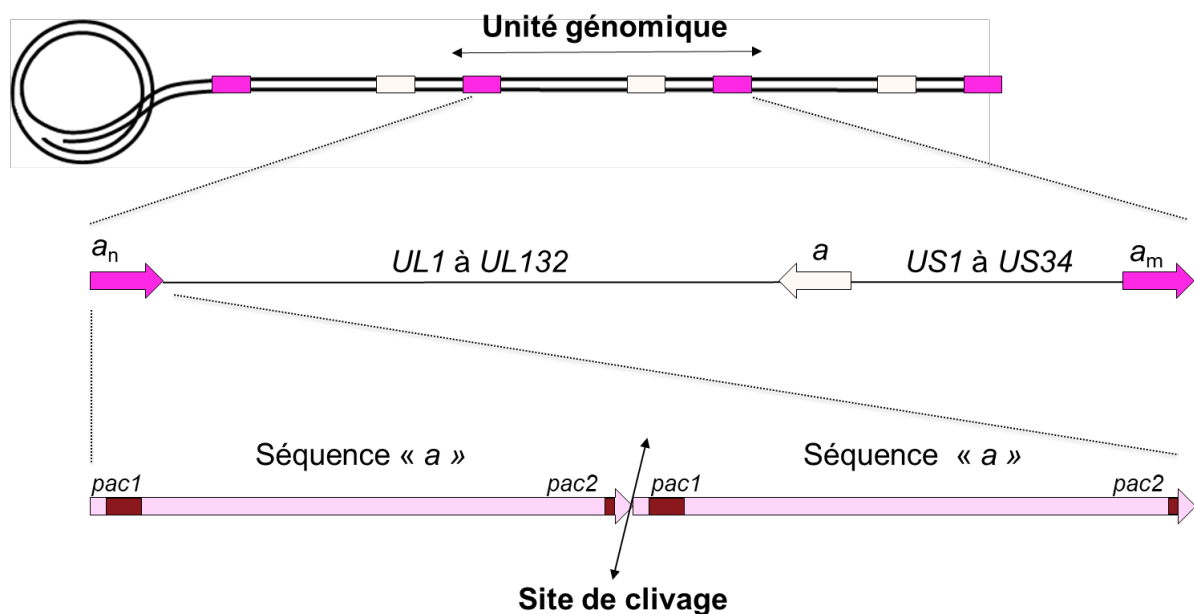


Figure 6 : Du génome au site de clivage.

*La réplication en cercle roulant entraîne la formation de concatémères. Ces unités génomiques successives servent ensuite de substrats pour le processus d'encapsidation de l'ADN. Le génome est organisé en deux régions. Le segment unique long (UL) et le segment unique court (US) sont flanqués de séquences répétées (TRL/IRL et TRS/IRS) contenant la séquence « a ». Les séquences **pac1** et **pac2** sont présentes dans chaque séquence « a ». Adapté de Ligat et al., 2018.*

Les gènes présents dans le génome du CMVH sont exprimés en cascade selon l'avancement de la réplication virale. Les gènes très précoces « **Immediate early** » (IE, α) sont les premiers à être transcrits et ne dépendent pas de la synthèse *de novo* des protéines. Ils sont déclenchés peu après l'entrée dans la cellule et leurs produits sont impliqués dans l'activation et la répression de gènes viraux et cellulaires. Les gènes précoces « **Early** » (E, β) sont répartis en deux groupes, l'un est impliqué dans la synthèse de l'ADN viral, le clivage et l'encapsidation du génome viral ainsi que dans l'assemblage des particules virales. Le second met en place l'environnement cellulaire nécessaire à la réplication du génome viral. Enfin les gènes tardifs « **Late** » (L/ γ) sont les derniers à être transcrits et codent pour les protéines de l'enveloppe, du téguement et de la capside (**Figure 7**).

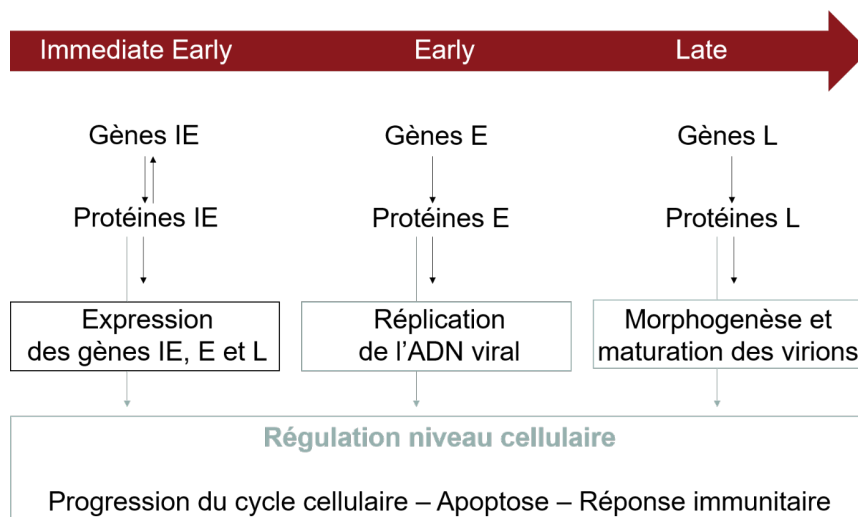


Figure 7 : Expression et fonctions des gènes viraux lors du cycle de réplication viral.

Au cours du cycle viral, le génome du CMVH est exprimé dans une cascade régulée et coordonnée temporellement conduisant à la synthèse de trois catégories de protéines virales décrites comme très précoces ou « Immediate Early » (IE ou α), précoces ou « Early » (E ou β) et tardives ou « Late » (L ou γ). Les protéines IE, exprimées à des niveaux variables tout au long du cycle régulent la synthèse des autres protéines IE, E et L. Les protéines tardives sont essentiellement impliquées dans la constitution du virion. Adapté Ligat, thèse d'université, 2017.

II.3. La réplication virale

Le CMVH possédant une étroite spécificité d'espèce, n'infecte que l'homme. Cependant de nombreux types cellulaires sont permissifs à l'infection *in vivo* (Plachter et al., 1996; Sinzger et al., 1995). *In vitro*, les cellules de choix pour l'isolement viral sont les fibroblastes humains embryonnaires. La durée du cycle cellulaire, étudié dans les fibroblastes, est le plus long parmi les herpèsvirus puisqu'il faut 96 à 120 h pour détecter de nouveaux virions infectieux dans le surnageant de culture (Mazeron, 2002).

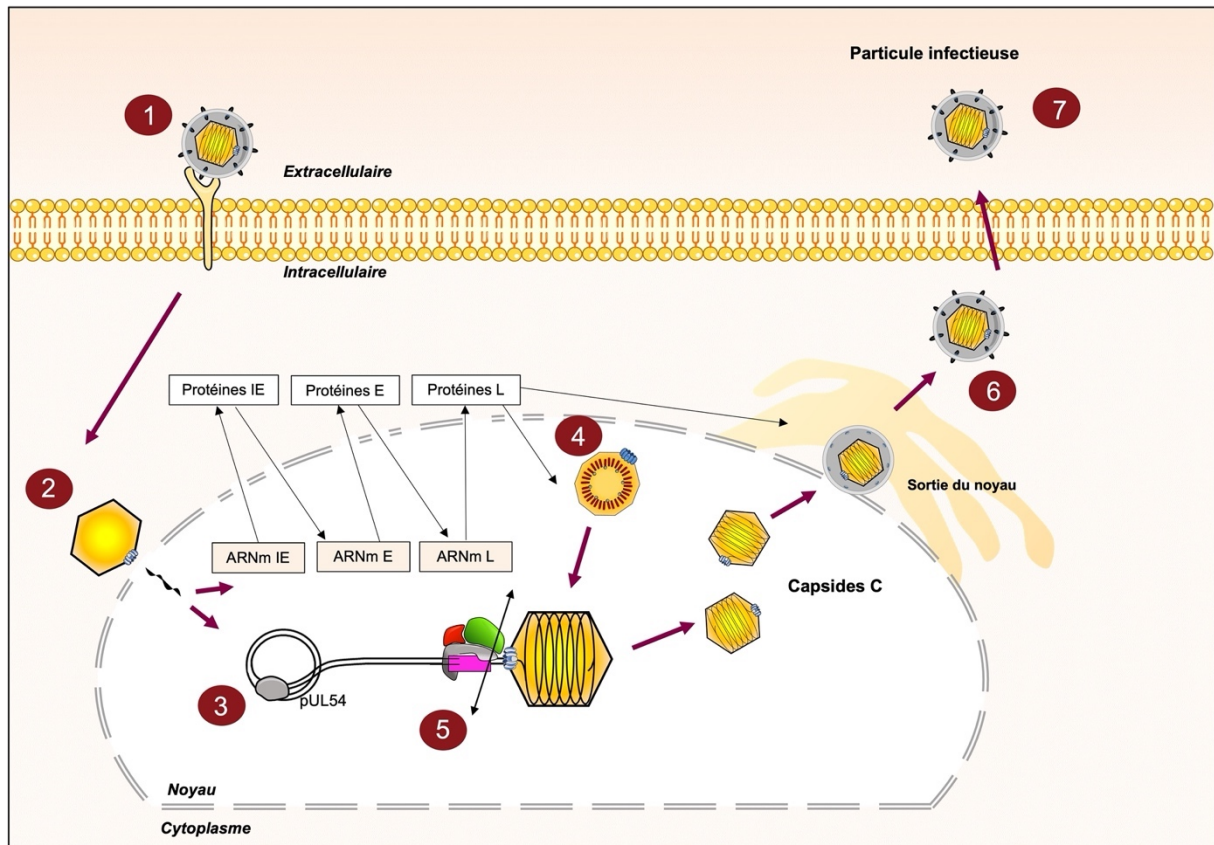


Figure 8 : Cycle viral du CMVH.

Après la liaison et l'entrée dans la cellule hôte (1), la capside est transportée vers le pore nucléaire et délivre l'ADN viral dans le noyau (2). Après la réplication du génome (3), les procapsides sont formées (4) puis une étape d'encapsidation de l'ADN se produit et se termine par le clivage des concatémères (représenté par la flèche noire à double sens), libérant l'ADN viral dans la capside (5). Les capsides C sont considérées comme un précurseur du virus infectieux. La particule virale achève sa maturation au niveau de l'appareil de Golgi avec ajout de l'enveloppe virale. Les particules sont ensuite transportées dans des vésicules pour être excrétées hors de la cellule (6 et 7). Adapté de Muller et al., 2021.

L'infection débute par une étape d'attachement médiée par la liaison des glycoprotéines d'enveloppe du CMVH au(x) récepteur(s) de la cellule hôte (**Figure 8, 1 et Figure 9**).

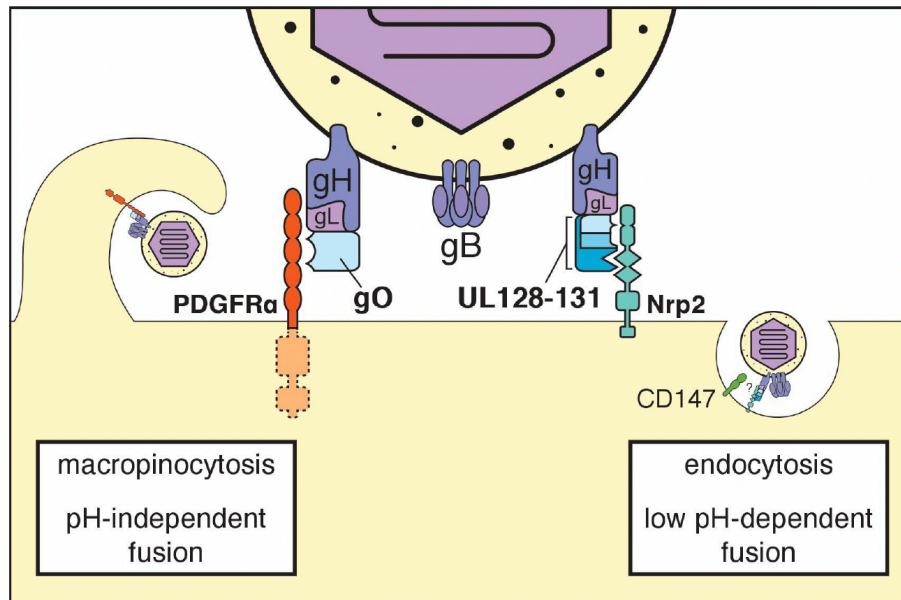


Figure 9 : Liaison des glycoprotéines d'enveloppe du CMVH au(x) récepteur(s) de la cellule hôte.

Récepteurs des complexes gH/gL du CMVH. Le complexe trimérique gH/gL/gO (trimère) interagit avec PDGFRα pour entraîner un mode d'entrée indépendant du pH qui implique la macropinocytose. Le complexe pentamérique gH/gL/UL128-131 (pentamère) interagit avec Nrp2 dans un mode d'entrée qui implique l'endocytose et une diminution du pH. Le CD147 semble également être requis dans ce dernier mode d'entrée. (Nguyen and Kamil, 2018)

Une fois les glycoprotéines liées, l'entrée du virus se fait soit par fusion, soit par endocytose, selon le type de cellule et les conditions (**Figure 8,1 et Figure 9**). Dans les cellules épithéliales et endothéliales, l'endocytose se produit et, à mesure qu'il pénètre, le virus est enfermé par la membrane plasmique dans un endosome. L'échappement de l'endosome nécessite une acidification, le faible pH déclenchant la fusion des protéines de la membrane virale avec la membrane endosomale (Wang and Shenk, 2005). Dans les fibroblastes, l'entrée se fait par fusion directe avec la membrane plasmique et les virions ne sont pas enfermés dans les endosomes, l'entrée directe est donc indépendante du pH (Mazeron, 2002).

Après la fusion membranaire, certaines protéines tégmentaires sont libérées tandis que d'autres restent étroitement liées à la capsid où elles interagissent avec le système dynéine-microtubules de l'hôte afin de la transporter vers un pore nucléaire (Ogawa-Goto et al., 2003) (**Figure 8, 2**). L'ADN viral est ensuite libéré dans le noyau par le complexe du pore nucléaire (Kobiler et al., 2012).

Une fois que l'ADN viral est libéré de la capsidie dans le noyau, l'étape de réplication débute ; son initiation correspondrait à l'ouverture de l'ADN double brin par le complexe hélicase-primase. L'ADN viral est synthétisé par la polymérase pUL54 dont l'activité est stimulée par sa protéine accessoire pUL44 (**Figure 8, 3**). Le génome viral est ensuite clivé et encapsidé dans une capsidie au travers des protéines portails pUL104 par l'intervention du complexe terminase (**Figure 8, 5**) (Ligat et al., 2018; Muller et al., 2021a).

La capsidie est assemblée dans le noyau par association entre les protéines MCP, SCP et celles du triplex à l'aide des précurseurs des protéines d'assemblage (pUL80 et pUL80.5). Les protéines pUL104 sont incorporées dans la capsidie afin de former le portail (**Figure 8, 4**).

La translocation de la capsidie du noyau vers le cytoplasme implique la rupture de l'enveloppe nucléaire composée entre autres d'un réseau dense de lamines. La déstabilisation de cette structure est médiée par la phosphorylation des lamines grâce aux protéines pUL50, pUL53 et pUL97 formant le complexe de sortie nucléaire. La capsidie peut alors traverser l'enveloppe nucléaire (**Figure 8, 6**) et achever sa maturation au niveau de l'appareil de Golgi avec l'ajout de l'enveloppe virale. Les virions sont ensuite excrétés hors de la cellule (**Figure 8,7**) (Mocarski Jr., 2007).

Pendant l'infection, trois types de capsides sont détectées dans la cellule hôte (**Figure 9 et 10**). Ces formes de capsides, à savoir A, B et C, représentent respectivement des capsides vides, des capsides contenant des protéines d'assemblage et des capsides contenant de l'ADN viral. La morphologie de la capsidie reste similaire quel que soit son type, mais la composition protéique diffère sur les enveloppes interne et externe de la capsidie (Tandon et al., 2015).

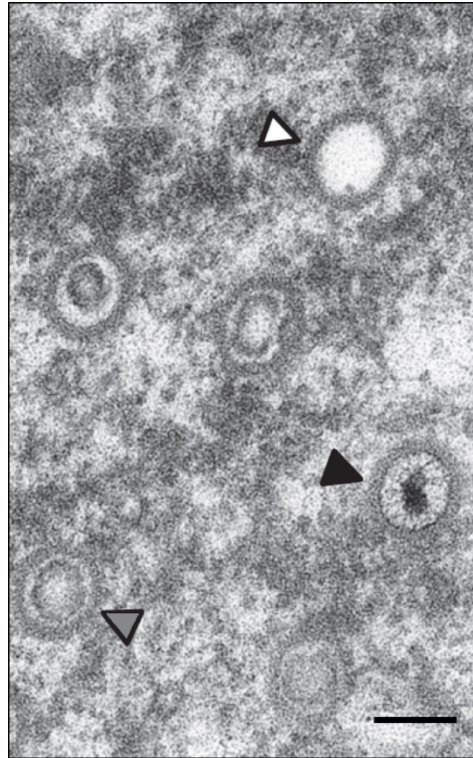


Figure 10 : Observation des capsides A, B et C du CMVH au microscope électronique. Cellules RPE-1 (*Retinal Pigmented Epithelial*) transfectées par adénofection et observées au microscope électronique. Les capsides A, -B, -C, sont respectivement représentées par un triangle blanc, un triangle gris et un triangle noir. L'échelle correspond à 100 nm (Borst et al., 2016).

Les capsides C sont identiques ou du moins similaires à celles trouvées dans les virions matures. Elles représentent les procapsides ayant correctement encapsidé le génome viral. Les capsides A sont essentiellement creuses et ne contiennent ni ADN ni protéines d'assemblage (ou protéine « *scaffold* »). Les capsides de type B contiennent des protéines d'assemblage, mais pas d'ADN, cela suggère que **(I)** la capside se prépare à l'étape d'encapsidation ou que **(II)** les protéines d'assemblage n'ont pas été dégradées à temps pour permettre l'encapsidation de l'ADN (Muller et al., 2021a; Tandon et al., 2015) **(Figure 10, figure 11)**. Alors que les trois formes de capsides sont présentes dans le noyau et dans les compartiments cytoplasmiques, les capsides C prédominent dans le cytoplasme. Lorsqu'elles sont libérées de la cellule, les capsides A et B semblent constituer une population appelée particules enveloppées non infectieuses.

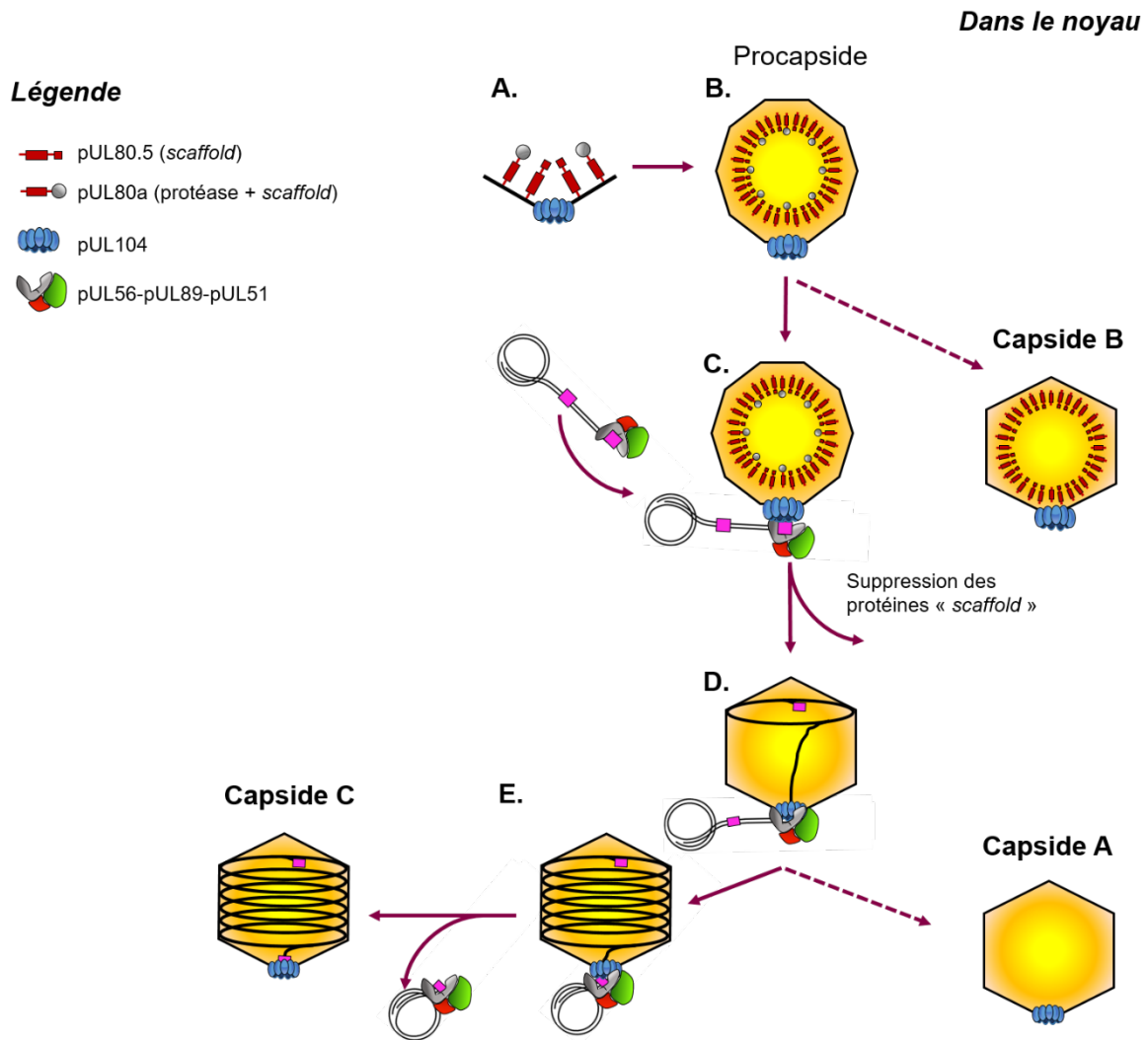


Figure 11 : Capside et encapsidation.

La formation de la nucléocapside est initiée par l'assemblage des protéines de capsid comprenant les MCP (noir), SCP (noir), les triplex (noir), les protéines portails (bleu) et les protéines d'assemblage (rouge et gris) (A. et B.). La maturation de la nucléocapside est réalisée par l'activation de la protéase qui effectue une digestion des protéines d'assemblage. Dans le même temps, le complexe terminase reconnaît les motifs « pac » (« cis-acting packaging signal ») représentés en rose (C.). Le complexe effectue alors un premier clivage de l'ADN viral et exerce son activité ATPase pour favoriser la translocation du génome dans la capsid (D.). Les protéines du complexe terminase effectuent un second clivage et libèrent l'ADN viral dans la capsid (E.). Enfin, le complexe se dissocie de la capsid C et est prêt pour l'étape suivante de conditionnement de l'ADN. Adapté de Muller et al., 2021.

III. Traitements de l'infection à CMVH

Les molécules antivirales, au sens large, comprennent aussi bien les produits virucides, les molécules virostatiques que des agents immunologiques. Les traitements actuellement disponibles pour prévenir et traiter l'infection à CMVH sont virostatiques et visent pour la plupart l'étape de réplication de l'ADN viral. De nouvelles molécules ciblant d'autres cibles sont en cours d'essai clinique ou sont récemment utilisées en pratique clinique dans des indications encore assez limitées.

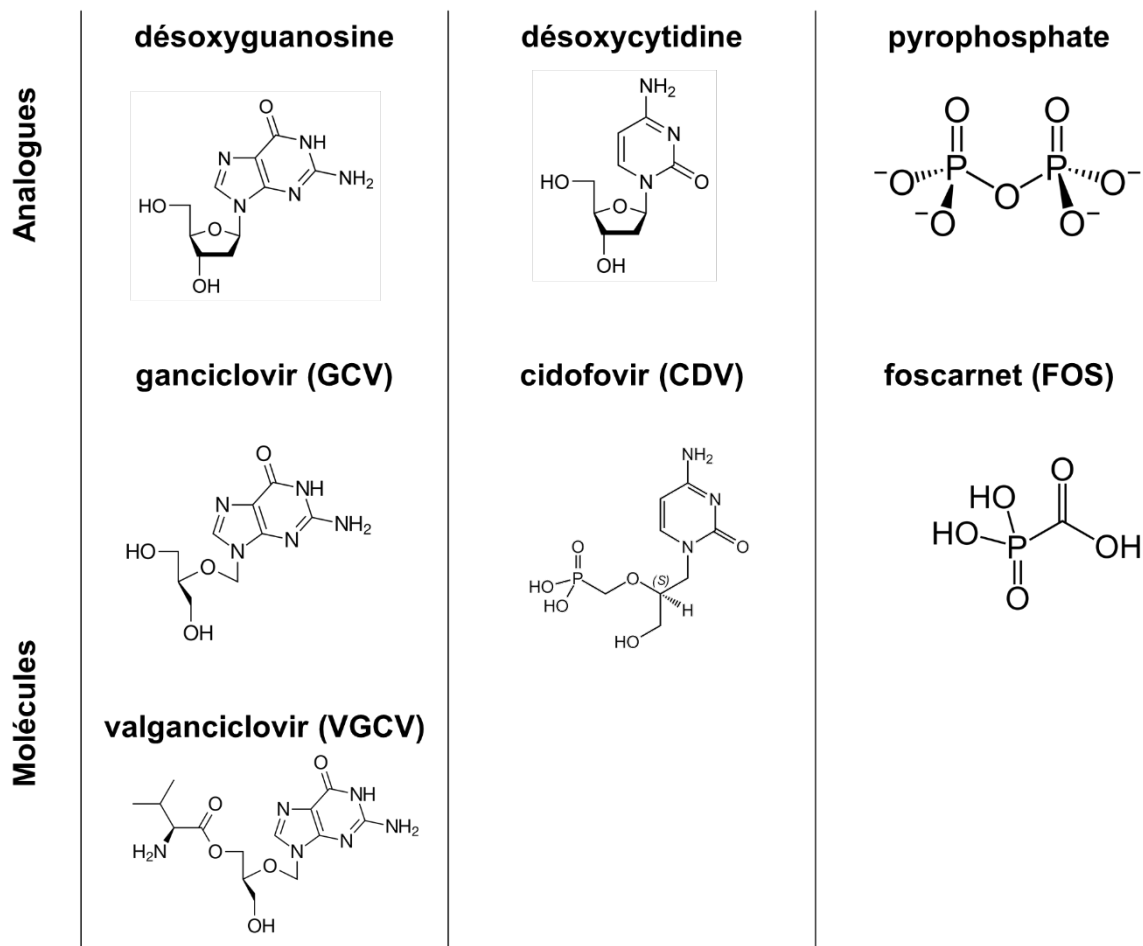


Figure 12 : Structures chimiques des molécules antivirales ciblant la polymérase virale et leurs analogues.

Le ganciclovir et le valganciclovir sont des analogues de la déoxyguanosine. Le cidofovir est un analogue de la déoxycytidine. Le foscarnet est un analogue du pyrophosphate.

III.1. Les inhibiteurs de la polymérase virale pUL54

Le **ganciclovir** (GCV) est la première molécule ayant démontré un bénéfice clinique pour les patients immunodéprimés atteints de maladie à CMV (Britt and Prichard, 2018; Kotton et al., 2010), pour les nourrissons infectés congénitalement (Kimberlin et al., 2015) et pour la prévention de la maladie du CMV (Green et al., 2016). Le GCV, ou 9 - (1,3-dihydroxy-2-propoxyméthyl) - guanine, est un analogue nucléosidique synthétique de la 2-désoxyguanosine (**Figure 12**). Cette molécule doit d'abord être phosphorylée en une série d'étapes pour donner le métabolite triphosphate actif (**Figure 13**). L'étape initiale de phosphorylation est spécifiquement catalysée par la kinase virale pUL97, suivie de deux événements de phosphorylation ultérieurs catalysés des kinases cellulaires (Britt and Prichard, 2018). Une fois formé, le métabolite actif est un substrat de l'ADN polymérase du CMV et inhibe de façon compétitive l'élongation de l'ADN viral (Biron et al., 1985; Britt and Prichard, 2018).

Le **valganciclovir** (VGCV) est une prodrogue du GCV possédant une meilleure biodisponibilité. Il doit subir une étape d'hydrolyse avant d'être phosphorylé par la kinase virale pUL97 et les kinases cellulaires. Comme le GCV, le VGCV est prescrit en clinique chez les sujets transplantés d'organes solides depuis son approbation en 2000. Ces deux molécules possèdent une bonne efficacité pour traiter un nouveau-né ayant une infection symptomatique congénitale à CMV. Ces molécules permettent entre autres de diminuer les atteintes neurologiques et d'éviter une détérioration de l'audition (Pasternak et al., 2018). Malgré leur efficacité, les effets secondaires qu'elles induisent ne sont pas négligeables (anomalies hématologiques, notamment la neutropénie, l'anémie et la thrombocytopénie) et peuvent entraîner l'arrêt du traitement (Britt and Prichard, 2018; Krishna et al., 2019). Par ailleurs, des mutations de résistance sont décrites sur les gènes codant la polymérase pUL54 et la kinase pUL97. Ces mutations peuvent conférer différents niveaux de résistances aux GCV et VGCV (Chou, 2020; Chou et al., 2003; Lurain and Chou, 2010). Leur concentration pour réduire de moitié le nombre de particules infectieuses (EC50) est de 2,5 à 8 μM *in vitro* (Chou et al., 2003). En dépit des effets secondaires et de l'apparition de résistance au traitement, le GCV reste une molécule de choix dans le traitement de l'infection à CMV.

Le **cidofovir** (CDV) ou (S^o -1 -(3-hydroxy-2-phosphoryl-methoxypropyl) cytosine), est un analogue de la désoxycytidine monophosphate qui nécessite d'être phosphorylé deux fois par les kinases cellulaires sans phosphorylation préalable par la kinase pUL97 (**Figure 12 et 13**). Le métabolite diphosphate actif du CDV entre en compétition avec la désoxycytidine triphosphate et est incorporé dans l'ADN comme substrat alternatif de la polymérase virale où

il agit comme un terminateur de chaîne. Cet antiviral s'est révélé efficace dans le traitement des infections à CMVH chez les personnes co-infectées par le VIH, mais sa néphrotoxicité et son manque de biodisponibilité orale limitent son utilité clinique. Le CDV peut être utilisé comme traitement secondaire lorsqu'une résistance au GCV est soupçonnée. Le plus grand atout du CDV est peut-être son activité antivirale à large spectre qui inclut d'autres virus à ADN, ce qui est utile chez les patients co-infectés. L'EC50 du CDV *in vitro* est de 0,5 à 1 μM (Chou et al., 2003).

Le **foscarnet** (FOS) est un analogue du pyrophosphate et ne nécessite aucune intervention anabolique de la part d'enzymes virales ou cellulaires (**Figure 12 et 13**) (Britt and Prichard, 2018; Gerna et al., 2019). Cette molécule est efficace contre un large spectre de virus à ADN et a été approuvée pour le traitement des infections par le CMVH en 1991. Le FOS se lie de manière non compétitive au site de liaison du pyrophosphate de l'ADN polymérase pUL54 et bloque ainsi le clivage du pyrophosphate des nucléosides triphosphates lors de l'élongation de l'ADN viral (Crumpacker, 1992). Le FOS a été initialement approuvé pour le traitement de la rétinite à CMVH chez les patients atteints du SIDA (Walmsley et al., 1988). Il est également administré en cas d'échec thérapeutique du GCV pour les sujets transplantés (Britt and Prichard, 2018; Gerna et al., 2019). À la suite d'un traitement prolongé, des mutations de résistance peuvent apparaître. Elles sont localisées dans le gène codant la protéine pUL54 et peuvent donner lieu à une résistance croisée au GCV et au CDV (Chou, 2020; Lurain and Chou, 2010). *In vitro*, l'EC50 du FOS est compris entre 40 et 400 μM (Chou et al., 2003). Cette molécule est néphrotoxique et peut induire des ulcérations des muqueuses (Britt and Prichard, 2018; Gerna et al., 2019). Malgré ces limites, l'activité antivirale à large spectre du FOS rend ce médicament utile pour le traitement des infections résistantes au GCV. Il a également été approuvé pour le traitement des infections à HSV résistantes à l'aciclovir.

L'**aciclovir** (ACV) et sa prodrogue le **valaciclovir** (VACV) ciblent la polymérase virale et doit être triphosphorylé pour être sous une forme active. L'ACV et le VACV sont des molécules antivirales très puissantes contre les infections à HSV et VZV, cependant, elles présentent une activité antivirale très modeste contre le CMVH. Le VACV a été validé en prophylaxie pour prévenir l'infection à CMVH chez les transplantés rénaux (Lowance et al., 1999).

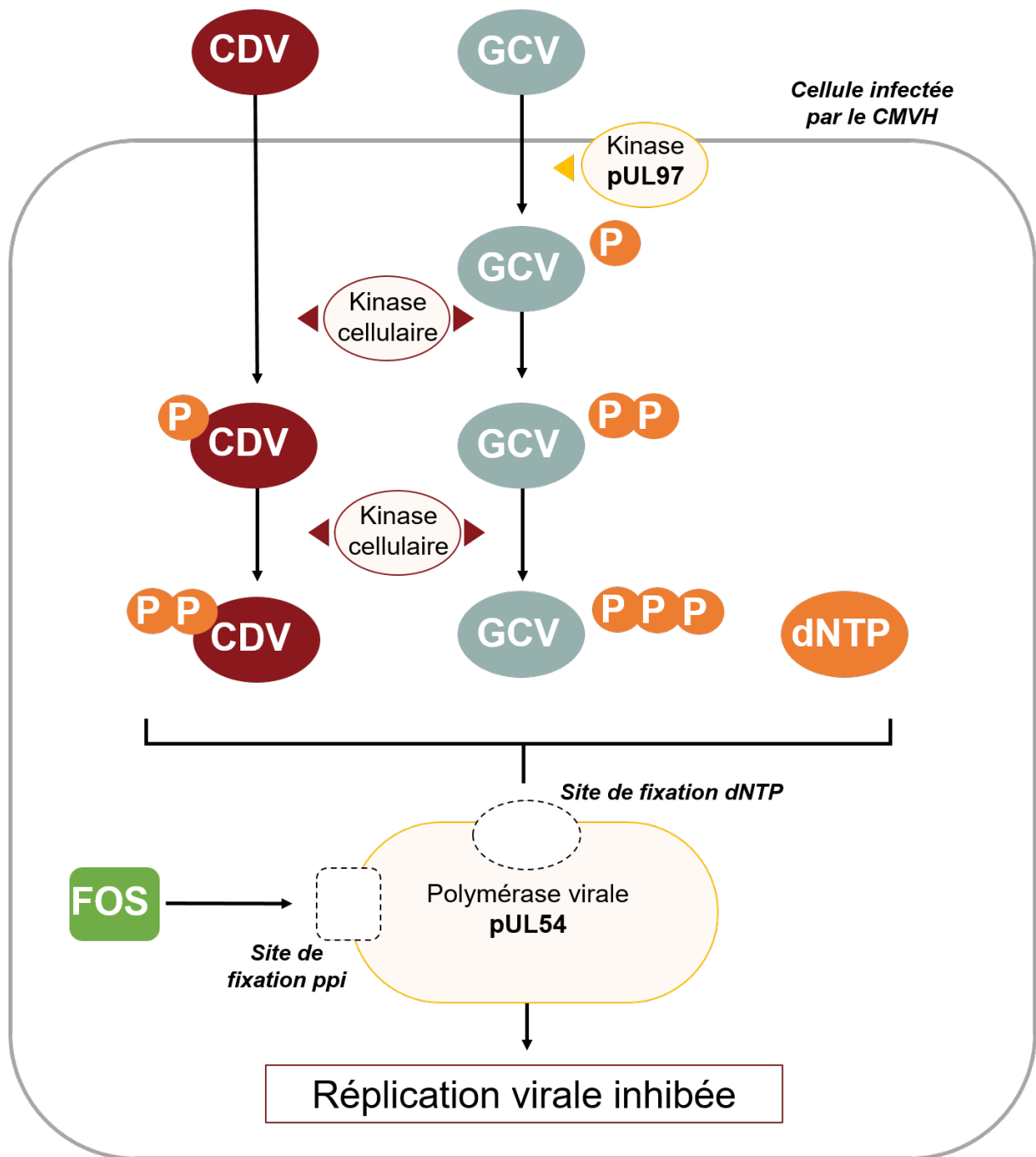


Figure 13 : Mécanisme d'action des principaux antiviraux contre le CMVH.

Dans la cellule infectée par le CMVH, le GCV et VGCV subissent une phosphorylation par la kinase pUL97 et les kinases cellulaires. La phosphorylation du CDV est indépendante de la pUL97 ; les kinases cellulaires ajoutent deux phosphates. PPI : pyrophosphate. Adapté de El Chaer et al., 2016.

III.2. L'inhibiteur de la kinase virale pUL97

Maribavir

Le **maribavir** (MBV) est un composé anti-CMVH prometteur administré par voie orale. Cette molécule inhibe la kinase virale pUL97 impliquée dans l'étape de réplication et dans la sortie nucléaire des capsides virales (Krosky et al., 2003; Prichard, 2009). Ainsi, l'association MBV et GCV est contre-indiquée puisque ce dernier nécessite trois phosphorylations dont une est réalisée par pUL97 (Chou and Marousek, 2006). Le MBV, actif *in vitro* avec une EC50 d'environ 0,3 μ M, démontre une efficacité *in vitro* et *in vivo* sur des souches résistantes au ganciclovir, au foscarnet et au cidofovir (Drew et al., 2006). Par ailleurs cette molécule se distingue des autres agents antiviraux par l'absence d'effets indésirables hématologiques ou néphrologiques et une bonne biodisponibilité (Koszalka et al., 2002). Cependant, des mutations de résistances dans les gènes *UL97* et *UL27* ont été identifiées *in vitro* et *in vivo* (Chou et al., 2020; Maertens et al., 2019; Piret and Boivin, 2019). *UL27* encode pour la protéine pUL27, nécessaire à la fonction de pUL97 (Piret and Boivin, 2019).

Les premiers essais cliniques de phase II ont été menés chez des receveurs de greffes d'organes solides et de cellules hématopoïétiques. Le MBV s'est révélé efficace à une dose ≥ 400 mg 2 fois par jour pour négativer la virémie chez les patients atteints d'une infection à CMVH réfractaire ou résistante au traitement antiviral (Papanicolaou et al., 2019). Par ailleurs, le maribavir à une dose d'au moins 400 mg deux fois par jour a démontré une efficacité similaire à celle du valganciclovir en traitement préemptif chez les receveurs de greffes de cellules hématopoïétiques ou d'organes solides (Maertens et al., 2020). Les résultats d'un essai clinique randomisé de phase III ont confirmé son efficacité chez les patients receveurs de cellules souches hématopoïétiques ou d'organes solides ayant une infection à CMVH réfractaire ou résistante aux antiviraux (Avery et al., 2021). Récemment, le MBV a été approuvé par la *Food and Drug Administration* américaine en novembre 2021 pour le traitement des patients adultes souffrant d'une infection/maladie à cytomégalovirus post-transplantation réfractaire au traitement par ganciclovir, valganciclovir, cidofovir ou foscarnet (Halpern-Cohen and Blumberg, 2022).

III.3. Les inhibiteurs du complexe terminase

En raison des effets néfastes (toxicité et apparition de mutation de résistances) entraînés par l'administration des molécules ciblant l'ADN polymérase virale, il est nécessaire de trouver de nouvelles cibles thérapeutiques. Étant donné son rôle crucial dans la formation de nouveaux virions infectieux, l'étape d'encapsidation de l'ADN viral est explorée pour le développement de nouvelles approches thérapeutiques. Le ciblage des protéines virales impliquées dans cette étape s'est avéré être une approche intéressante pour le développement de nouvelles stratégies thérapeutiques. Les protéines impliquées dans l'étape d'encapsidation sont détaillées dans le chapitre VI.

BDCRB et ses dérivés

Les molécules basées sur le squelette chimique du benzimidazole sont des analogues nucléosidiques actifs contre le CMVH initialement synthétisés par Townsend *et al.* (Townsend *et al.*, 1995). On retrouve le **BDCRB** (2-bromo-5,6-dichloro-1-D-ribofuranosyl benzimidazole), le **TCRB** (l'analogue 2-chloro du BDCRB) et le **Cl₄RB** (4,5,6-tetrachloro-1-(2, 3, 5 -tri-O-acetyl-β-D-ribofuranosyl) benzimidazole) (Underwood *et al.*, 1998). Le BDCRB et TCRB, plus étudiés cibleraient les protéines pUL56, pUL89 et pUL104. Le mécanisme d'action n'est pas connu, mais pourrait être à l'origine de l'inhibition de la réplication soit par un blocage entre les protéines d'encapsidation et l'ADN soit un blocage de l'activité de ces protéines (Scheffczik, 2002). Par ailleurs, des mutations de résistances au BDCRB ont été identifiées sur les gènes codant pour pUL56 et pUL89 (Krosky *et al.*, 1998). Les essais portant sur ces molécules ont été arrêtés du fait de leur courte demi-vie (Williams *et al.*, 2003).

Le composé **GW-275175X** est un dérivé D-ribofuranose du BDCRB avec un spectre d'activité antivirale similaire. Sa concentration pour réduire de moitié le nombre de particules infectieuses (EC₅₀) est de 1,4 μM *in vitro* (Underwood *et al.*, 2004). Cette molécule développée par GlaxoSmithKline cible également cette étape et a une demi-vie plasmatique plus longue. Cependant, des essais *in vitro* avec des doses croissantes de cette molécule montrent l'émergence mutations de résistances dans les gènes *UL56* et *UL89* (Britt and Prichard, 2018).

Tomeglovir

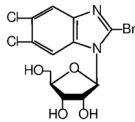
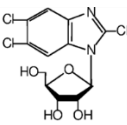
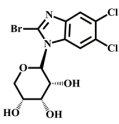
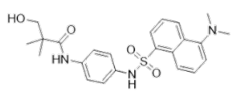
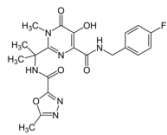
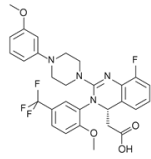
La molécule BAY-38-4766, également appelée **tomeglovir**, est un inhibiteur de la réplication du CMVH agissant lors de l'encapsidation de l'ADN viral (Reefschlaeger, 2001). Cet inhibiteur non nucléosidique semble cibler les protéines pUL89 et pUL104. Des études *in vitro* ont déterminé que le tomeglovir possède une activité contre les isolats cliniques du CMVH

(Reefschlaeger, 2001). Cependant, des mutations de résistance ont été observées après analyse des souches résistantes dans pUL89 et pUL104 *in vitro* (Reefschlaeger, 2001). Les essais cliniques de phase 1 entrepris par Bayer® ont été interrompus (Gentry et al., 2019).

Raltégravir et ses dérivés

Des essais immuno-enzymatiques (ELISA) publiés par Wang *et al.* en 2017 ont montré que l'acide hydroxypyridone carboxylique, composant du **raltégravir** utilisé comme inhibiteur de la RNase H du VIH, inhibe l'activité nucléasique de pUL89 à des concentrations micromolaires (Nadal et al., 2010a; Wang et al., 2017). De la même manière, différents dérivés du squelette 3-hydroxypyrimidine-2, 4-dione se sont montrés prometteurs pour le développement d'inhibiteurs de pUL89 (Wang et al., 2018).

Tableau 4 : Aperçu des inhibiteurs de l'étape d'encapsidation du CMVH.

Nom	Composé	Phase de développement
BDCRB		Préclinique
TCRB		Préclinique
GW-275175X		Essai clinique de phase 1 Arrêt
Tomeglovir		Essai clinique de phase 1 Arrêt
Raltégravir		Préclinique
Letermovir		Essai clinique de phase 3 Approuvé en prophylaxie chez HSCT

HSCT : Receveur de cellules souches hématopoïétiques.

Letermovir

Le **letermovir** (AIC246), de formule chimique (4S)-8-Fluoro-2-[4-(3-methoxyphenyl)-1-piperaziny]-3-[2-methoxy-5-(trifluoromethyl)phenyl]3,4-dihydro-4-quinazoliny, est le **premier agent antiviral commercialisé dans la catégorie des inhibiteurs du complexe terminase**. Cette molécule de la classe des quinazolines est hautement spécifique du CMVH mais également pleinement active contre les souches de CMVH résistantes aux inhibiteurs de l'ADN polymérase (Gerna et al., 2019; Lischka et al., 2010).

Les données précliniques obtenues pour cette molécule révèlent sa très forte activité antivirale contre les souches de laboratoire et cliniques avec des toxicités observées à des concentrations bien supérieures à l'EC90 (Lischka et al., 2010). De plus, ce composé s'est avéré hautement sélectif pour le CMVH, démontrant peu ou pas d'activité contre d'autres herpèsvirus (Lischka et al., 2010).

Avec un bon profil de sécurité et de tolérance, le letermovir a démontré son efficacité en prévention de l'infection à CMVH chez les receveurs de greffes allogéniques de cellules hématopoïétiques durant les essais cliniques de phase II et III (Chemaly et al., 2014; Piret and Boivin, 2019). Néanmoins, l'administration d'une dose sous-optimale de 60 mg/jour a entraîné l'émergence d'un isolat résistant (Chemaly et al., 2014; Lischka et al., 2016). L'essai de phase III a commencé dès 2014 (par Merck Sharpe and Dohme Corps) et s'est achevé fin 2016 (identifiant ClinicalTrials : NCT02137772) (Marty et al., 2017). Ainsi, sous le nom de Prevymis™, le letermovir a été approuvé fin 2017 par la *Food and Drug Administration* américaine en prophylaxie chez les adultes séropositifs pour le CMVH recevant une transplantation allogénique de cellules souches hématopoïétiques [R+]. Cette molécule est également évaluée lors d'essais cliniques pour la prophylaxie ou le traitement du CMVH chez les transplantés d'organes séropositifs (Aryal et al., 2019; Veit et al., 2020).

La caractérisation initiale du mécanisme d'action du letermovir a donné un profil similaire à celui du tomeglovir indiquant une inhibition de l'encapsidation de l'ADN viral (Lischka et al., 2010). D'autres expériences menées par Goldner *et al.* ont permis de déterminer que le letermovir inhibe le clivage des concatémères d'ADN viral et la formation des virions CMVH matures en ciblant la protéine pUL56 du complexe terminase viral (Goldner et al., 2011).

Malheureusement, des mutations de résistance sont rapidement apparues après sa mise sur le marché. Elles se situent principalement dans le gène codant la protéine pUL56 et confèrent pour certaines de hauts niveaux de résistance (Chapitre **V.1**) (Chou, 2015; Goldner et al., 2014).

III.4. Les immunoglobulines

Deux types d'immunoglobulines sont sur le marché mondial ; les immunoglobulines administrées par voie intraveineuse (IVIg) et les immunoglobulines hyperimmunes (HIG). Le principe repose sur l'administration d'un cocktail d'immunoglobulines spécifiques dirigées contre le CMVH qui entraîne la neutralisation de l'infectivité virale (Aiba et al., 2017). Ces immunoglobulines seraient bénéfiques pour le traitement des infections à CMVH sévères, en particulier pour les infections congénitales (El-Qushayri et al., 2021) et chez les patients immunodéprimés (Snydman, 2001). Malgré leur intérêt dans le traitement préventif des patients transplantés et de l'infection congénitale à CMVH, les 2 seuls essais randomisés n'ont pas montré d'efficacité des HIG dans le traitement de l'infection congénitale à CMVH (Hughes et al., 2021; Revello et al., 2014).

Afin d'enrichir les données sur l'efficacité controversée des immunoglobulines hyperimmunes dans la prévention et le traitement de l'infection congénitale, notre équipe a étudié l'effet du Cytotect CP®. Mon implication dans ce travail a porté sur l'analyse des données et sur la révision du manuscrit (Annexe 4).

➔ ***Potential of Anti-CMV Immunoglobulin Cytotect CP® In Vitro and Ex Vivo in a First-Trimester Placenta Model***

Perrine Coste Mazeau, Chloé Jacquet, Clotilde Muller, Mathis Courant, Chahrazed El Hamel, Thierry Chianea, Sébastien Hantz and Sophie Alain

Pour évaluer l'effet du Cytotect CP®, des essais ont été effectués *in vitro* et *ex vivo* dans un modèle de placenta du premier trimestre (Morère et al., 2015). Ce modèle, développé et utilisé au sein de notre unité, repose sur l'infection des villosités placentaires (issues d'interruption volontaire de grossesse (IVG) chez des patientes séronégatives pour le CMVH) à partir d'une couche de fibroblastes infectés par les souches de CMVH VHL/E ou TB40E produisant des virions libres dans le surnageant.

In vitro, les essais de neutralisation ont été effectués sur des cellules MRC-5 et ARPE-19 (CRL-2302™) avec les souches de CMVH VLH/E ou TB40/E. Les résultats de ces essais montrent une inhibition significative du nombre de foyers infectieux sans aucune toxicité (DN50 : 0,011-0,014 U.mL⁻¹ pour la souche VHL/E et 0,032-0,033 U.mL⁻¹ pour la souche TB40/E).

Concernant les essais *ex vivo* (modèle placentaire du premier trimestre), différents essais ont été effectués pour évaluer l'effet du Cytotect CP® : **(A)** des essais de neutralisation **(B)** des essais de prévention de l'infection des villosités **(C)** des essais d'efficacité **(Figure 14)**.

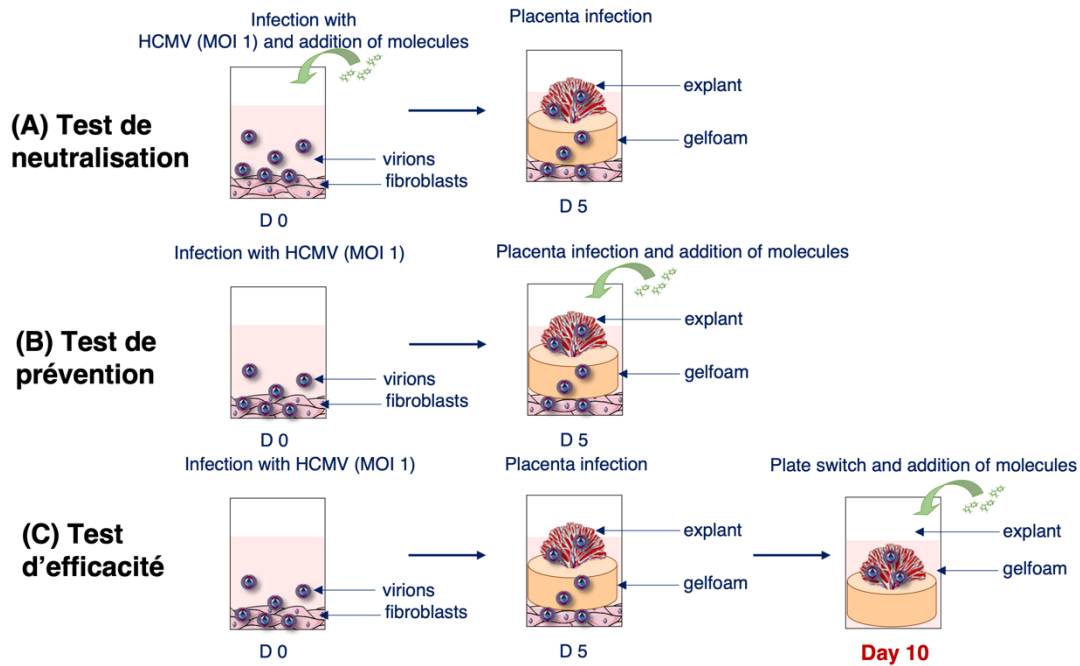


Figure 14 : Essais effectués pour évaluer l'effet du Cytotect CP®.

A. Test de neutralisation : le virus est neutralisé par Cytotect CP® avant l'ajout des villosités placentaires. D_0 est le premier jour de l'infection. **B.** Test de prévention de l'infection des villosités : Cytotect CP® et les explants sont ajoutés simultanément sur les cellules infectées. D_0 est le premier jour de l'infection. **C.** Essai d'efficacité : Cytotect CP® est ajouté sur les explants après 5 jours d'infection. D_0 est le premier jour de l'infection et D_5 correspond ici à 5 jours après l'infection du placenta.

Dans tous les cas ; la viabilité des villosités n'est pas impactée par la présence du Cytotect CP® aux concentrations testées. Dans les essais *ex vivo* de neutralisation (**Figure 14, A**), nous avons mis en évidence un effet significatif de la molécule identique aux résultats de l'étude *in vitro*. Dans les essais de prévention (**Figure 14, B**), la molécule a montré une efficacité dans la réduction de la charge virale au 7^e jour d'infection. Enfin, les essais d'efficacité (**Figure 14, C**) se sont révélés être sans effet avec le Cytotect CP®.

L'efficacité suggérée du Cytotect CP® en prophylaxie est soutenue par nos résultats *in vitro* et dans les villosités placentaires, montrant une bonne efficacité et une faible toxicité dans les différentes voies d'infection.

IV. Stratégies thérapeutiques

Prise en charge des infections/maladies à CMVH

Prévention de l'infection à CMVH

La prophylaxie sert à prévenir l'infection à CMVH chez un sujet à risque et peut être abordée selon deux protocoles. **(I)** La prophylaxie dite classique consiste en l'administration indiscriminée de l'un des médicaments anti-CMVH sur une durée de 3, 9 voire 12 mois après une transplantation selon le type de transplantation considérée et le niveau d'immunosuppression nécessaire. Les recommandations des principales molécules antivirales sont indiquées dans le tableau 5. **(II)** Le traitement préemptif consiste en une surveillance continue de l'infection sans traitement antiviral. La surveillance repose par exemple par la mesure de la charge virale dans le sang 1 fois par semaine. Une prise en charge est nécessaire lorsque la charge virale dépasse le seuil préétabli pour éviter l'apparition de manifestations cliniques sévères (Gerna et al., 2019). La stratégie sur le traitement préemptif permet de réduire de manière significative le nombre de patients traités donc indirectement de réduire les effets néfastes de la toxicité médicamenteuse et de limiter l'apparition de mutation de résistance. En revanche cette stratégie nécessite un plus grand suivi du patient (Gerna et al., 2019).

Traitement de l'infection/maladie à CMVH

Le traitement curatif consiste en l'administration d'une molécule antivirale à un sujet infecté déjà symptomatique pour éviter qu'il ne développe une maladie à CMVH ou qu'elle ne se complique. Le traitement de choix pour traiter l'infection symptomatique à CMVH chez un patient transplanté d'organe solide est le GCV ou le VGCV. Dans le cas où l'infection est réfractaire à ces deux molécules, le FOS peut être administré. En cas de résistance à toutes ces molécules, le MBV peut être envisagé dans le cadre d'une autorisation temporaire d'utilisation (ATU) ou le letermovir hors autorisation de mise sur le marché (AMM). Enfin, le CDV peut être administré dans le cadre d'une autorisation d'accès compassionnel (AAC). Les recommandations des principales molécules antivirales sont indiquées dans le **tableau 5**.

Tableau 5 : Traitements et prévention de l'infection à CMVH.

Traitement	Prophylaxie	Curatif	Voie d'administration
ganciclovir	2,5 mg/kg 2x/jour	5 mg/kg 2x/jour	Voie intraveineuse
valganciclovir	450 mg 2x/jour	900 mg 2x/jour	Voie orale
letermovir	240/480 mg 1x/jour	Hors AMM	Voie orale
maribavir	<i>nr</i>	400 mg 2x/jour	Voie orale
foscarnet	<i>non</i>	90 mg/kg 2x/jour	Voie intraveineuse
cidofovir	<i>non</i>	5 mg/kg 1x/semaine	Voie intraveineuse

Hors AMM : hors autorisation de mise sur le marché, nr : non renseigné

V. Non-réponse au traitement et résistance

V.1. Définitions

L'absence de réponse, ou non-réponse au traitement se caractérise par une persistance de la charge virale, associée ou non à des signes cliniques d'infection à CMVH, chez un sujet prenant un traitement antiviral pendant au moins 3 semaines. Plusieurs raisons de non-réponse sont à envisager tels **(I)** qu'une posologie sous-optimale de l'antiviral **(II)** qu'une mauvaise distribution de la molécule au site de l'infection **(III)** une réponse immunitaire déficiente ou alors **(IV)** la présence d'une souche résistante. Lorsque les causes d'origines pharmacologiques et immunologiques sont écartées, il est probable que la souche virale soit résistante au traitement administré par sélection d'une mutation au niveau des gènes codant les protéines cibles des antiviraux.

De manière générale, deux facteurs favorisent l'émergence de souches résistantes aux antiviraux : **(I)** l'exposition prolongée, répétée de la molécule antivirale **(II)** le niveau d'immunodépression du sujet infecté. Comme pour la résistance des bactéries aux antibiotiques, l'émergence de mutations liées à une résistance est favorisée par l'administration de doses sous-optimales de la molécule antivirale.

Les infections à CMVH chez les patients immunodéprimés nécessitent des traitements prolongés, répétés et/ou à dose réduite. Ces conditions réunies favorisent alors l'émergence de souches mutantes résistantes où la fréquence de résistance se situe en **5 et 10 %** chez les sujets transplantés traités avec des inhibiteurs de la polymérase virale pUL54 (GCV, FOS, CDV,...). Par ailleurs, ce risque est plus élevé dans la configuration **D+/R-** et chez les sujets présentant un niveau d'immunosuppression plus élevé (Alain et al., 2004; Kotton et al., 2010).

Le mécanisme d'apparition de mutation de résistance est le suivant ; avant traitement par une molécule antivirale, les souches sauvages coexistent avec les souches mutantes générées suite à des erreurs au cours de la réplication de l'ADN viral (**Figure 15**). Certaines de ces mutations générées *de novo* peuvent affecter les gènes codant des protéines cibles des molécules antivirales et ainsi conférer une résistance. L'administration du traitement bloque la réplication des souches virales sensibles à celui-ci. Si la pression de sélection est maintenue, les souches virales portant une ou plusieurs mutations de résistance deviennent majoritaires (**Figure 15**). Au-delà du phénomène de résistance, ces mutations *de novo* participent à l'évolution des souches.

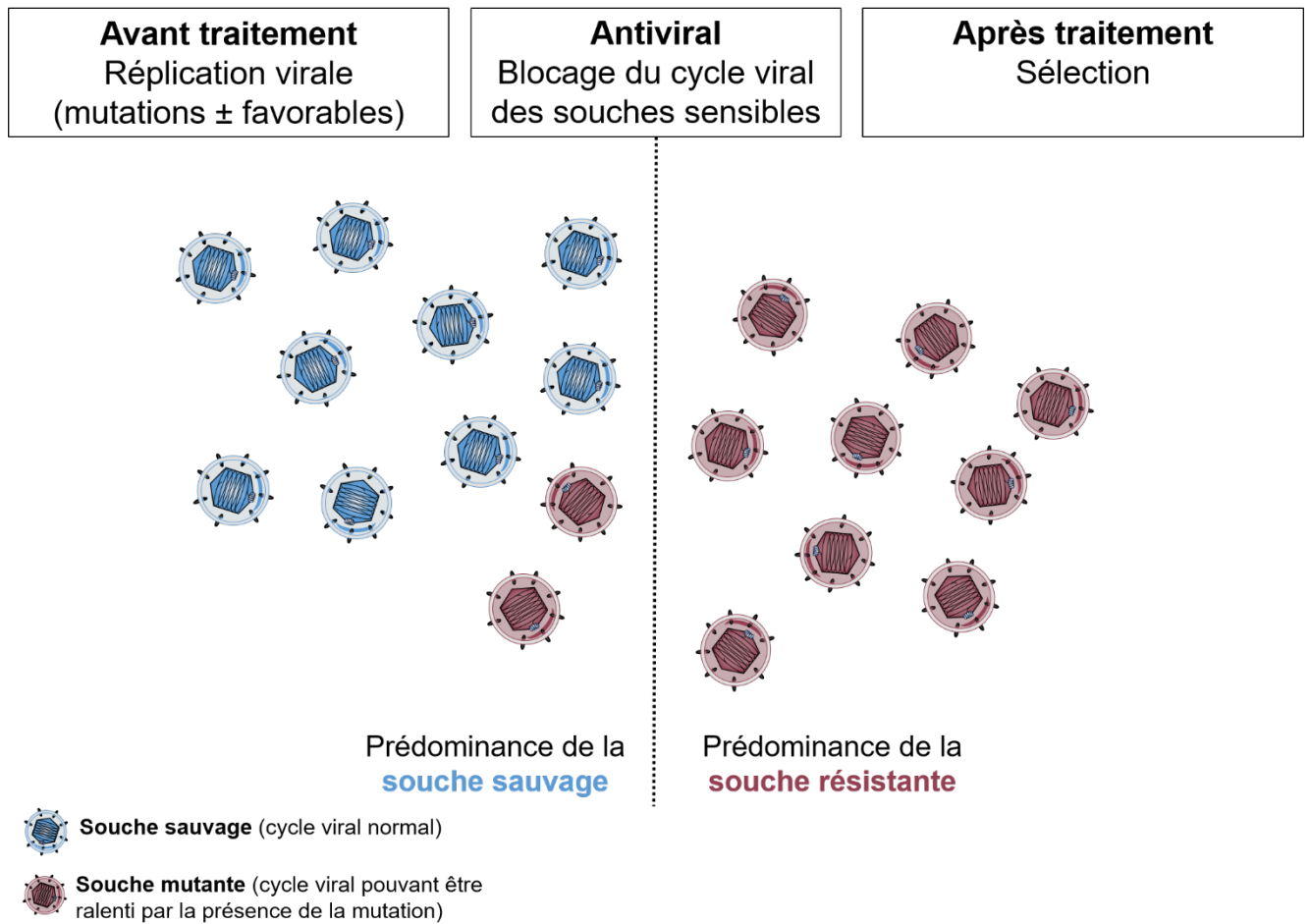


Figure 15 : Cinétique de l'émergence de souches résistantes.

Dans l'organisme, des souches sauvages et mutantes, générées par des erreurs lors de la réplication virale coexistent. L'administration d'un traitement bloque la réplication des souches sensibles. Si la pression de sélection est maintenue, les souches virales portant une ou plusieurs mutations de résistance deviennent majoritaires. Adapté de Ligat, thèse d'université, 2017.

V.1. Gènes et mutations de résistance

Les inhibiteurs de la réplication agissent par l'inhibition de la polymérase virale pUL54. Ainsi les mutations conférant une résistance à cette catégorie d'antiviraux sont situées dans le gène **UL54**. Le GCV étant à la fois un substrat de la kinase virale pUL97 et de la polymérase pUL54, des mutations de résistances sont rencontrées dans les gènes **UL97** et **UL54** codant pUL97 et pUL54 (Chou, 2020). De multiples mutations de résistance sont décrites dans les gènes **UL54** et **UL97**, à la fois *in vivo* et *in vitro*. Les **figures 16 et 17** représentent les cartes des mutations de résistances décrites dans gènes codant pour les protéines pUL54 et pUL97.

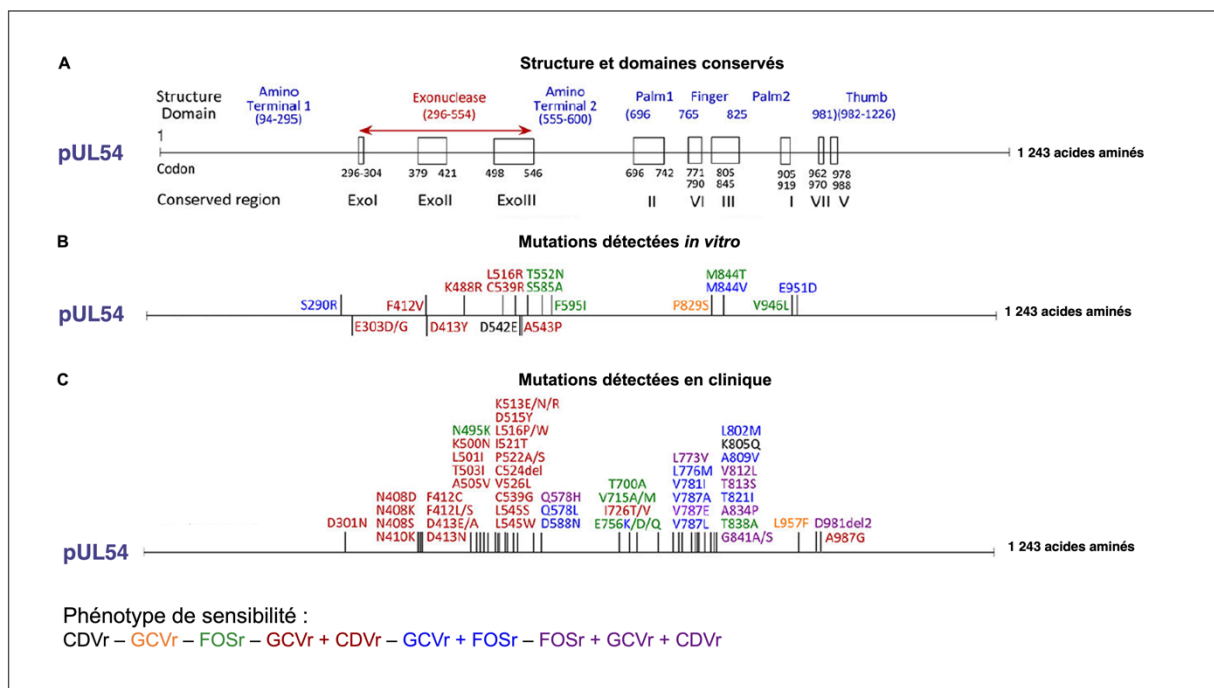


Figure 16 : Mutations de résistance dans la protéine pUL54.

Les mutations sont classées par couleur en fonction de leur phénotype de résistance. **A** montre la structure et les domaines conservés de pUL54. **B** et **C** montrent les mutations sélectionnées *in vitro* et les mutations détectées dans des échantillons cliniques avec des phénotypes de recombinaison documentés. Adapté de Chou, 2020.

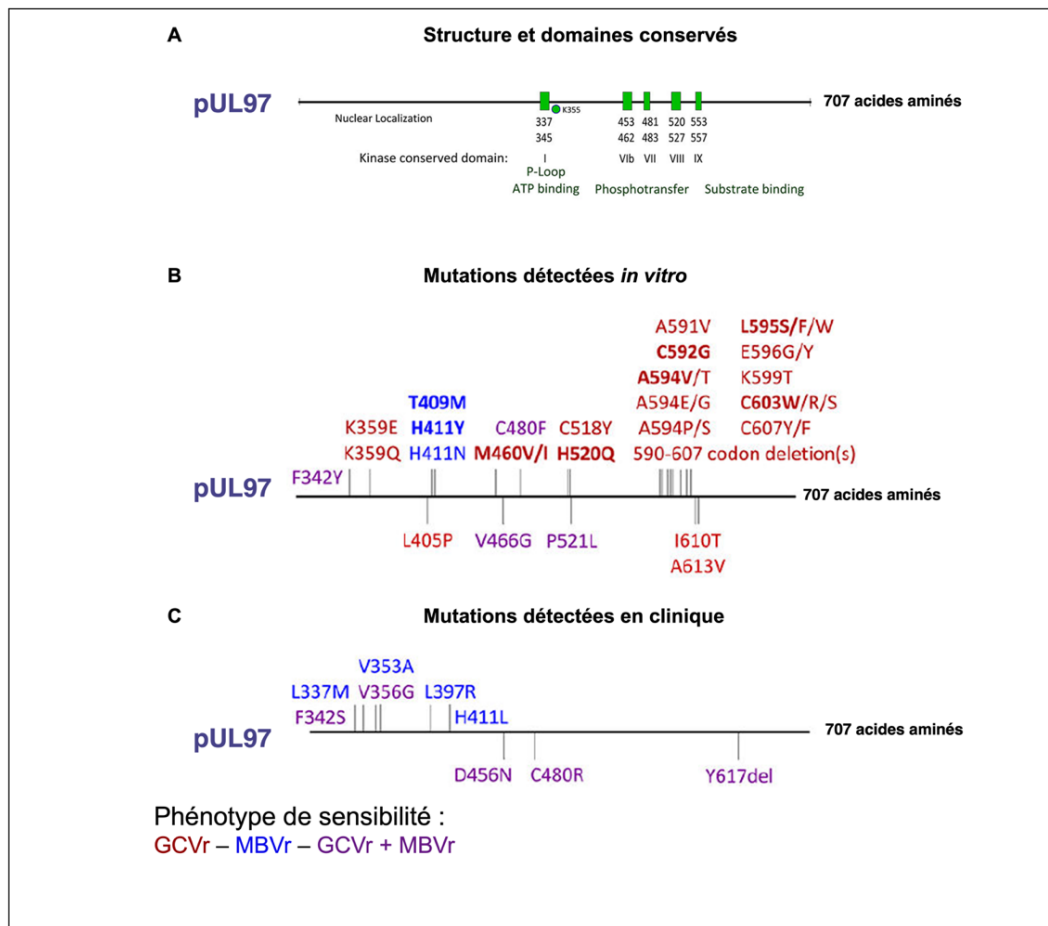


Figure 17 : Mutations de résistance dans la protéine pUL97.

La structure et les domaines conservés sont représentés en **A**. Les mutations détectées *in vitro* sont représentées en **B**. Celles détectées dans les échantillons cliniques figurent en **C**, les plus courantes sont en gras. Adapté de Chou, 2020.

Le letermovir cible le complexe terminase du CMVH; ainsi, il n'y a aucun risque d'induire une résistance croisée avec les antiviraux anti-CMVH existants. Malgré les avantages que cette molécule confère, l'apparition de mutations de résistance *in vitro* et *in vivo* a rapidement été rapportées (Chou, 2015; Goldner et al., 2014, 2011; Ligat et al., 2017). Les mutations de résistance caractérisées sont principalement situées sur le gène codant la protéine pUL56. Cependant, certaines mutations dans les gènes codant les protéines pUL89 et pUL51 ont été décrites *in vitro*. Un grand nombre des mutations découvertes dans pUL56 et toutes les mutations dans pUL51 et pUL89 confèrent une résistance de faible niveau (**Figure 18**). Plusieurs mutations confèrent des niveaux élevés de résistance et peuvent entraîner une aggravation des symptômes cliniques. C'est le cas pour les substitutions de la cystéine 325 de pUL56 (C325F, C325W, C325Y, C325R) qui confèrent une résistance absolue au letermovir (augmentation de la EC50 d'un facteur >3000) (Chou, 2020). De plus, la combinaison de deux ou plusieurs mutations conférant un faible niveau de résistance peut l'augmenter drastiquement (Chou, 2015) (**Figure 18**).

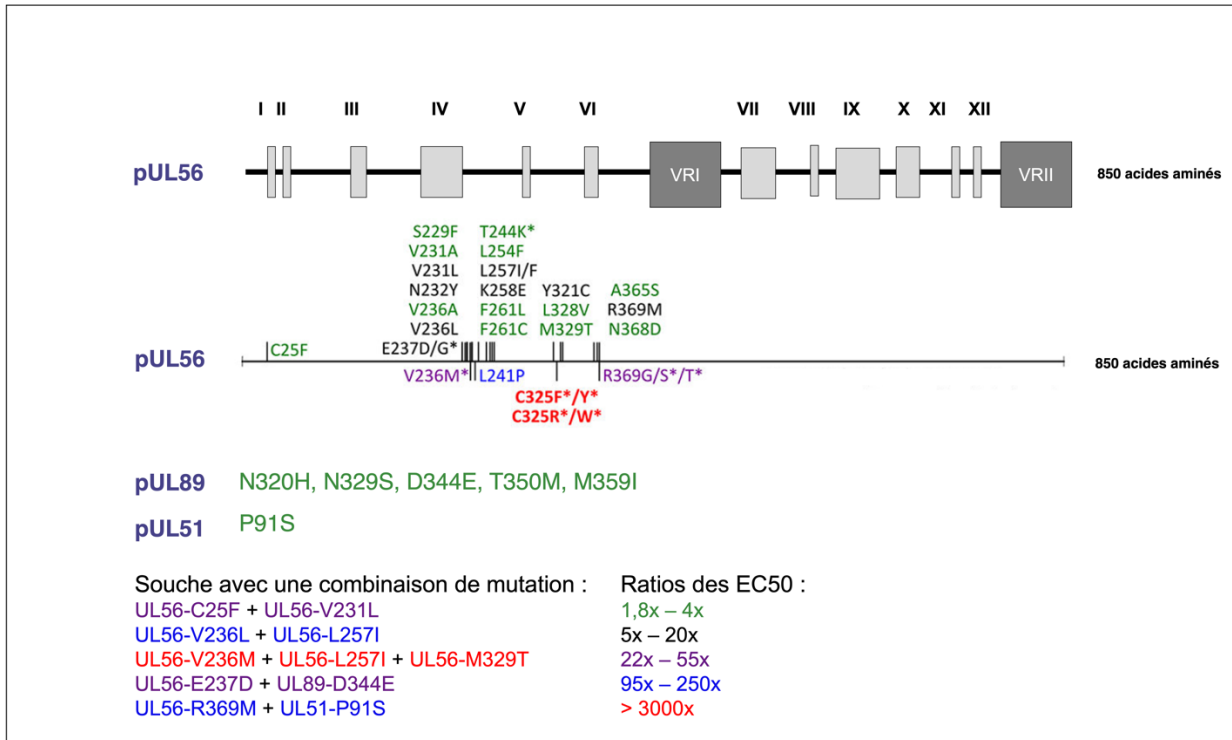


Figure 18 : Mutations de résistance dans les protéines pUL56, pUL89 et pUL51.

Les mutations de résistance au letermovir sont classées par couleur en fonction du degré de résistance conféré. Les mutations décrites dans des souches cliniques sont marquées avec un astérisque (*). Les combinaisons de mutations augmentent le niveau global de résistance, comme le montrent certaines mutations testées expérimentalement. Adapté de Chou, 2020.

V.2. Détection de la résistance

La détection de l'apparition d'une mutation de résistance repose sur des approches **génotypiques** et **phénotypiques**. Ces deux approches ne fournissent pas exactement le même type d'informations et sont donc complémentaires dans certaines situations. Par ailleurs, les contraintes techniques sont également très différentes entre les deux approches.

L'approche génotypique se base sur la recherche de substitutions nucléotidiques, délétions ou d'insertions par séquençage des gènes impliqués dans le mécanisme d'action de la molécule administrée (par exemple *UL54* et *UL97* pour les inhibiteurs de la réplication virale et *UL56* et *UL89* pour le letermovir). Grâce aux cartes de polymorphismes et de résistances établies, un changement de stratégie thérapeutique rapide peut-être envisagé en fonction des substitutions retrouvées.

L'approche phénotypique consiste à déterminer la sensibilité d'une souche isolée vis-à-vis d'un traitement. Cette technique présente l'inconvénient d'isoler la souche en culture cellulaire à partir d'un prélèvement (le plus souvent urine ou sang). De plus, elle ne permet pas de mettre en évidence une sous-population minoritaire résistante. Une autre approche phénotypique peut être utilisée, il s'agit de la construction de virus recombinants (**Figure 19**). Dans le cas où une substitution détectée par séquençage n'a jamais été décrite, son implication dans la résistance aux antiviraux peut être confirmée par cette approche. La substitution d'intérêt est transférée, par recombinaison homologe, dans le génome de la souche de référence AD169 du CMVH clonée dans un chromosome artificiel bactérien (BAC) et maintenue dans des bactéries (souche GS1783). Le virus recombinant est ensuite reconstitué dans des cellules en culture après transfection du clone BAC-CMVH. Les cellules sont infectées par le virus recombinant et par le virus sauvage (AD169) en présence d'une gamme de concentration de la molécule antivirale. Cinq jours après l'infection, le nombre de foyers infectieux est compté au microscope inversé. Pour évaluer le niveau de résistance, l'EC50 est calculé. Elle correspond à la concentration de la molécule testée permettant de réduire de 50 % la multiplication virale en culture cellulaire. Le rapport entre les valeurs de la EC50 du virus recombinant et du virus sauvage indique l'index de sensibilité (IS) de la souche pour la molécule. De cette manière, il est possible d'évaluer l'impact d'une ou plusieurs substitutions sur la capacité du virus à répliquer en présence ou non du traitement. Par ailleurs, une substitution peut augmenter ou diminuer la capacité du virus à répliquer, ainsi la souche portant cette substitution peut devenir prédominante ou pas chez un sujet infecté. Pour estimer cette capacité, une cinétique est effectuée sur 7 jours pendant lesquels le nombre de foyers infectieux est compté quotidiennement en comparaison à la souche sauvage.

Ces méthodes permettent de compléter les cartes de polymorphismes et de résistances des différents gènes impliqués dans le mécanisme d'action des molécules antivirales.

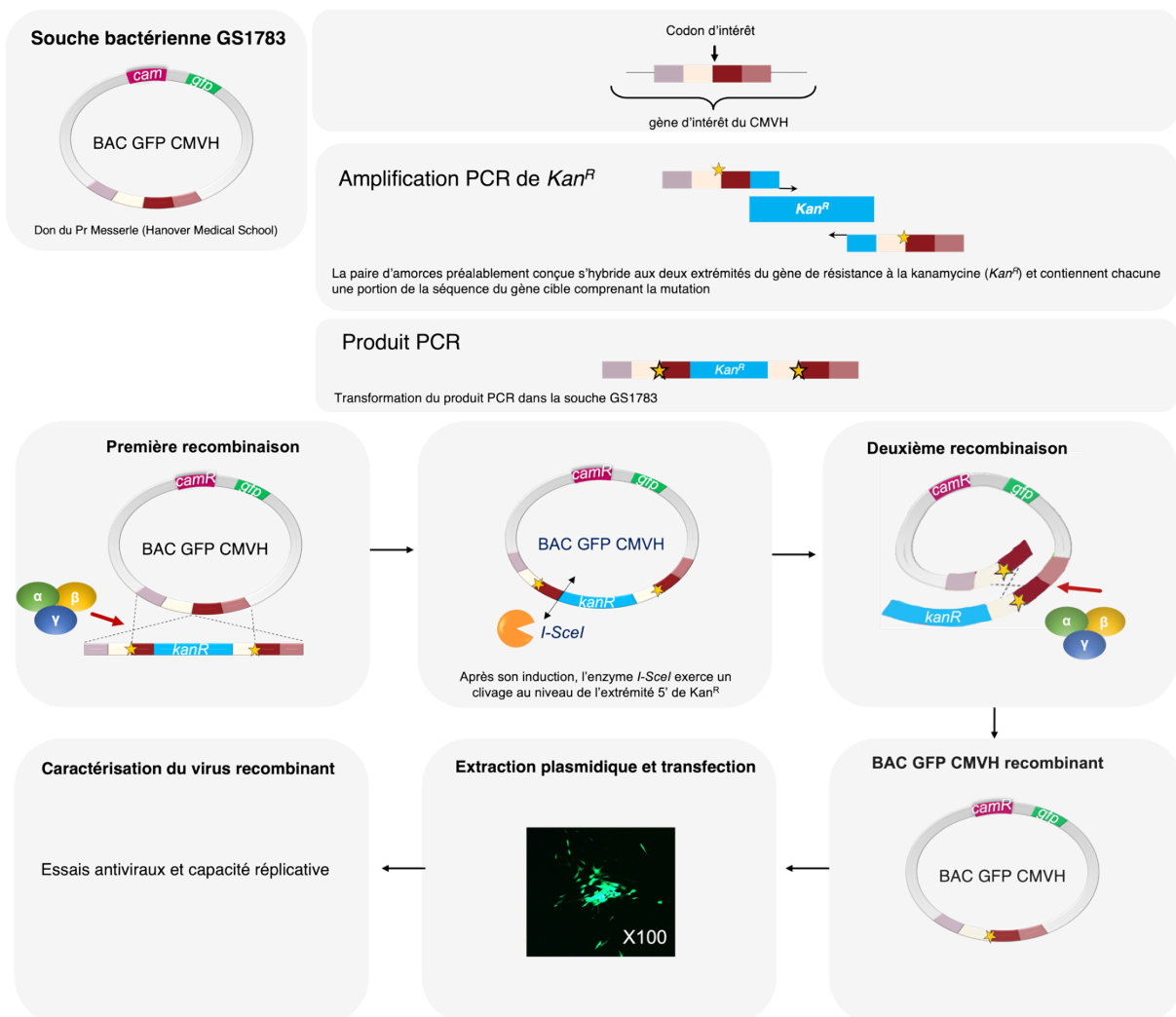


Figure 19 : Construction d'un virus recombinant par la méthode des BAC.

Au sein de notre équipe, nous disposons la souche bactérienne GS1783 contenant le génome du CMVH (souche AD169) couplé au gène codant la protéine fluorescente (GFP). La première étape consiste à amplifier le gène de résistance à la kanamycine (Kan^R) avec une paire d'amorce spécifique. Le produit PCR obtenu contient Kan^R encadré de 2 séquences homologues du gène cible et ainsi que la mutation d'intérêt. Le produit de PCR obtenu est transformé dans la souche GS1783. Une première recombinaison d'effectue. L'excision de la cassette Kan^R est rendue possible par l'induction de l'expression de l'enzyme *I-SceI*. *I-SceI* exerce un clivage spécifique au niveau de l'extrémité 5' de Kan^R . Une seconde recombinaison s'effectue. L'introduction de la mutation est validée par amplification et séquençage sanger avant l'extraction plasmidique et transfection dans des cellules MRC-5. Un virus recombinant fluorescent est obtenu, sa caractérisation peut être effectuée en culture cellulaire.

VI. Les protéines impliquées dans l'encapsidation de l'ADN viral, une cible d'intérêt pour le développement de nouveaux antiviraux

→ Le complexe terminase, une cible de choix dans le traitement de l'infection à cytomégalovirus humain (Annexe 3)

Gaëtan Ligat, **Clotilde Muller**, Sophie Alain, Sébastien Hantz

L'encapsidation de l'ADN viral dans une capsid néoformée est une étape essentielle au cycle viral se déroulant en phase tardive. Dans ce chapitre nous aborderons en détail les protéines participant à cette étape (Tableau 6) et le mécanisme supposé de l'encapsidation. Seront d'une part présentées les protéines composant le complexe terminase et d'autre part les 3 autres protéines identifiées comme essentielles à cette étape.

Tableau 6 : Gènes impliqués dans l'encapsidation de l'ADN viral chez les herpesvirus.

	α herpesvirus		β herpesvirus		γ herpesvirus		Notes
	HSV-1	VZV	CMVH	HHV-6	HHV-8	EBV	
Gènes codant les protéines d'encapsidation	<i>UL28</i>	<i>ORF30</i>	<i>UL56</i>	<i>U40</i>	<i>ORF7</i>	<i>BALF3</i>	Sous-unité du complexe terminase : Fixation spécifique au site « pac », associé à la capsid
	<i>UL15</i>	<i>ORF42/45</i>	<i>UL89</i>	<i>U66</i>	<i>ORF29</i>	<i>BGRF1/BDRF1</i>	Sous-unité du complexe terminase : motifs de fixation de l'ATP, domaine nucléase putatif
	<i>UL33</i>	<i>ORF25</i>	<i>UL51</i>	<i>U35</i>	<i>ORF67A</i>	<i>BFRF1A</i>	Interagit avec le complexe terminase et médie sa correcte localisation
	<i>UL32</i>	<i>ORF26</i>	<i>UL52</i>	<i>U36</i>	<i>ORF68</i>	<i>BFLF1</i>	Protéine potentiellement impliquée dans la localisation de la capsid dans le noyau
	<i>UL25</i>	<i>ORF34</i>	<i>UL77</i>	<i>U50</i>	<i>ORF19</i>	<i>BVRF1</i>	Forme un dimère asymétrique et interagis avec pUL17 et le complexe de sortie nucléaire
	<i>UL17</i>	<i>ORF43</i>	<i>UL93</i>	<i>U64</i>	<i>ORF32</i>	<i>BGLF1</i>	Ancrage du complexe terminase à la capsid et implication dans la détermination du site de la première réaction de clivage

HSV-1 : herpès simplex de type 1 ; **VZV** : virus de la varicelle et du zona ; **CMVH** : cytomégalovirus humain ; **HHV-6** : herpesvirus humain 6 ; **HHV-8** : herpesvirus humain 8 ; **EBV** : Virus Epstein-Barr.

Adapté de Muller et al., 2021

VI.1. Les protéines du complexe terminase

Le complexe terminase est un complexe **hétéro-oligomérique** ayant pour but de transloquer une unité génomique dans une procapside nouvellement formée. Les protéines composant ce complexe sont les protéines **pUL56**, **pUL89** et **pUL51** et ont chacune une fonction différente nécessaire au processus d'encapsidation. Les fonctions de ces protéines sont conservées chez les herpèsvirus (Tableau 6).

La protéine pUL56

La **protéine pUL56** a été identifiée et partiellement caractérisée en 1993 par homologie avec la protéine pUL28 (ou ICP 18.5) de l'HSV-1 montrée comme essentielle pour l'encapsidation de l'ADN viral (Bogner et al., 1993; Tengelsen et al., 1993). Depuis, de nombreuses études ont confirmé son implication dans l'encapsidation au travers des résultats soulignant des activités spécifiques des terminases.

L'étude de sa séquence primaire a permis de décrire 12 régions conservées, 2 régions variables et 2 régions riches en glycines et sérines pouvant conférer une certaine flexibilité à la protéine (**Figure 20**) (Champier et al., 2008). Parmi ces 850 résidus, certains ont été identifiés comme essentiels à la fonction du complexe.

La reconnaissance et l'interaction spécifique avec les motifs « **pac** » sont médiées par pUL56. Cette reconnaissance est essentielle pour le clivage de l'ADN (Bogner et al., 1998) et se produit dans des structures nucléaires appelées centre de réplication (Arvin and Arvin, 2007) où pUL56 s'accumule durant la phase tardive (Giesen et al., 2000; Scheffczik, 2002).

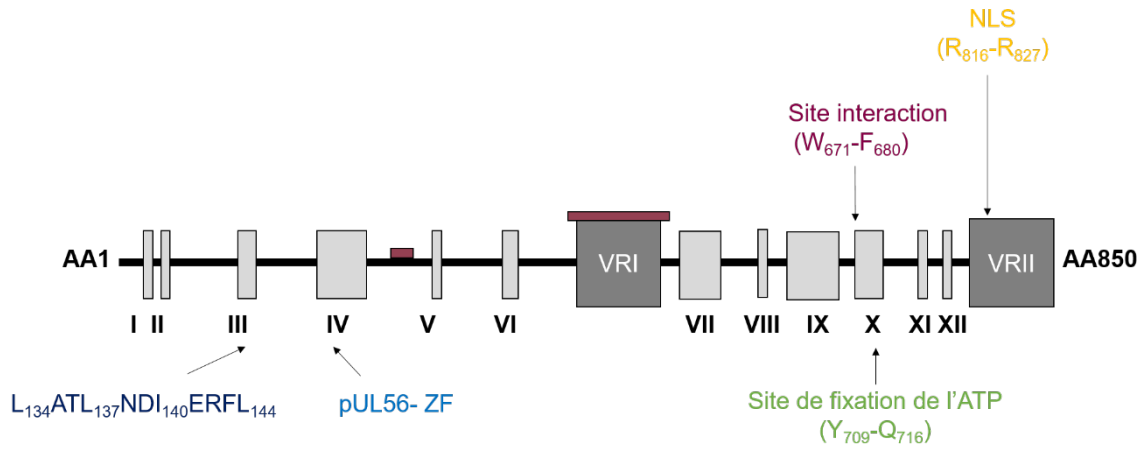
Son Signal de Localisation Nucléaire (NLS) situé dans la région variable II aux positions 816-827 (₈₁₆**RRVRATRKPRR**₈₂₇) lui permet d'être importée dans le noyau. Par « alanine scanning », les résidus **R822** et **K823** sont montrés comme essentiels pour la translocation nucléaire. Par ailleurs, l'interaction directe du NLS de pUL56 avec l'importine suppose une translocation nucléaire médiée par la voie dépendante de l'importine et ce, même lorsqu'elle est exprimée en l'absence de ses protéines partenaires (pUL89 et pUL51) (Giesen et al., 2000; Neuber et al., 2017). De plus, le NLS de pUL56 semble être à lui seul nécessaire pour le transport du complexe entier (pUL56-pUL89-pUL51) vers le noyau (Neuber et al., 2017).

pUL56 porte l'activité ATPasique permettant l'hydrolyse de l'ATP durant le processus d'encapsidation. Le site de liaison à l'ATP est localisé dans la partie C-terminale et implique les résidus ₇₀₉**YNETFGKQ**₇₁₆ de la région conservée **X (Figure 20)** (Hwang and Bogner, 2002; Scholz, 2003). Des expériences de mutagenèse dirigée ont indiqué que les résidus **G714** et

K715 sont essentiels pour l'hydrolyse de l'ATP. pUL56 porte également une activité nucléasique essentielle pour le clivage de l'ADN. Cependant, seule, elle n'exerce pas de clivage spécifique. L'action concertée entre pUL89 et pUL56 permettrait un clivage spécifique (Scheffczik, 2002).

Il a été montré par co-immunoprécipitation une interaction protéique entre la région C-terminale de pUL56 et pUL89 (Thoma et al., 2006). De manière plus spécifique, la séquence ⁶⁷¹**WMVVKYMGFF**₆₈₀ de pUL56 est essentielle pour cette interaction avec pUL89 (Ligat et al., 2017). De plus, l'extrémité C-terminale de pUL56 est également engagée dans une interaction avec les protéines portails pUL104 (Dittmer et al., 2005). Les résidus impliqués dans cette interaction ne sont pas identifiés.

D'autres motifs essentiels à la réplication virale ont été démontrés par la construction de virus recombinants portant des mutations au niveau des motifs putatifs. Ainsi le motif CXXC-CXXH impliquant les résidus **C191, C194, C217 et H219** formerait un doigt de zinc (Ligat et al., 2019). Ces résidus, conservés chez les herpèsvirus correspondent aux résidus C197, C200, C223 et H225 de l'HSV-1. La résolution tridimensionnelle du complexe terminase de l'HSV-1 identifie ces quatre résidus comme impliqués dans la formation d'un doigt de zinc (Zf) (Yang et al., 2020). De la même manière, le motif LATLNDIERFL, est également essentiel à la réplication virale. Il suggère l'appartenance de pUL56 à la famille des LAGLIDADG homing endonucléases (Ligat et al., 2019). Enfin, de potentiels motifs de type Leucine Zipper ont été déterminés *in silico* impliquant les résidus **L688-N710** et **L742-R766** respectivement (Bogner, 2002; Champier et al., 2008). L'implication de ces motifs est encore à démontrer.



L ₁₃₄ ATL ₁₃₇ NDI ₁₄₀ ERFL ₁₄₄		pUL56-ZF	
	130 140		190 210
ALPHA-HERPES		ALPHA-HERPES	
HSV_1	GT--VHMELCFLHDVENFLKQLNYCH	HSV_1	SHPFAVCFEELCVTANQGATIAARRLADRICHHTVQ
HSV_2	GD--VRMELCFLDHVENFLKQLNYCH	HSV_2	SHPFAVCFEELCVTANQGATIAARRLADRICHHTVQ
CeHV_1	GC--VDMELCFLDHVENFLKQLNYCH	CeHV_1	SHPFAVCFEELCVTANQGATIAARRLADRICHHTVQ
CeHV_2	DVR-VTRKSTVNDNAENLLKQVNYIH	CeHV_2	SHPFAVCFEELCVTANQGVARRLADRICHHTVQ
EHV_1	GP--IDAEVQFLHDAENFLKQLNYCH	EHV_1	THPSVCFEELCVTANQGEAVHRRLLLECTICHHTVQ
GaHV_3	GS--VRTEIKFLHDVENILKQLNYCH	GaHV_3	SQPSVCFEELCVTANSGDSAHKRIIGKICHTVTK
MeHV_1	GP--VTTEIKFLHDVENILKQLNYCH	MeHV_1	SQPSVCFEELCVTANSGDSAHKRIIGKICHTVTK
HHV_3	GY--VSSEIQFLHDIENFLKQLNYCY	HHV_3	AHPFAICFEELCVTANQGEATHRRLLGCICTHVTK
SUID	GR--VETELQFLHDAENLLKQLNYCH	SUID	AQPFAVCFEELCVTANQGEATHRRLLGCICTHVTK
GaHV_1	MSSIIISKELVLINDVENFMKQLNYCH	GaHV_1	GQPCVYCLEELSVTANQGETIYRRLGKICCHLTR
GaHV_2	MSSIIISKELVLINDVENFMKQLNYCH	GaHV_2	GQPCVYCLEELSVTANQGETIYRRLGKICCHLTR
BETA-HERPES		BETA-HERPES	
AD169	NVR-FSVSLATLNDIERFLCKMNVVY	AD169	GTTFAQCYEELTIIPNQGRSLNKRLLQGLICHIAV
HHV_6_B	GVE-FIVQLSTLNDIEQLISKINSVY	HHV_6_B	TKTFAQCYEELTLTPNQGKSLRRLHGHKFCCHLTE
HHV_6_A	GVE-FIVQLSTLNDIEQLISKINSVY	HHV_6_A	TKTFAQCYEELTLTPNQGKSLRRLHGHKFCCHLTE
CCMV	ELA-LTIDLATLNDVERLLCKINCIVY	CCMV	GTTFAQCYEELTIIPNQGRSLNKRLLQGLICHIAV
RhCMV	NVK-FSVTLATLNDIERFLCKMNVVY	RhCMV	GTTFAQCYEELTIIPNQGRSLNKRLLQGLICHIAV
MCMV	PELALTDLATLNDVERLLCKINCIVY	MCMV	TVTFAQCYEELMAVFNQGRSINRMOGLICCHITTI
RCMV	GLH-LTIELATLNDIERLLCKINCIVY	RCMV	TSTFAQCYEELMAVFNQGRSINRRIEGLICCHITTV
GAMMA-HERPES		GAMMA-HERPES	
HHV_8	NWA-LLEKLSLINDVEIFFKRLLSSVF	HHV_8	NLPFALELQVEVCLTPNQGTSLQAMLPTDTCCHICT
HHV_4_1	GHK-VDVSLCLINDIEILMKRINSVF	HHV_4_1	SVPFAVQVGLMVLPHNPNSTAEQTHVSCCHLAV
HHV_4_2	GHK-VDVSLCLINDIEILMKRINSVF	HHV_4_2	SVPFAVQVGLMVLPHNPNSTAEQTHVSCCHLAV

I	M21-P31	V	Q272-W300	IX	I617-L658	VRI	I425-W485
II	F41-Q62	VI	E325-I374	X	Y676-F713	VRII	V778-R850
III	L134-E141	VII	E514-R572	XI	V732-F744		
IV	C191-I220	VIII	Y590-L600	XII	D755-L764		

Figure 20 : Régions variables et conservées de la protéine pUL56 du complexe terminase du CMVH. La protéine pUL56 est composée de 12 régions conservées (I-XII) et de 2 régions variables (VRI-VRII). Le signal de localisation nucléaire de pUL56 (NLS) est représenté jaune. Le site de fixation de l'ATP est représenté en vert. Les rectangles bordeaux correspondent aux régions flexibles riches en Glycine-Sérine aux positions 25 à 259 et 415 à 487. Alignement des séquences des régions conservées homologues appartenant aux sous-familles α , β et γ des herpesvirus. La numérotation des séquences est conforme à celle des résidus de la souche de référence AD169 du CMVH. Les résidus clés impliqués dans la formation des motifs sont représentés par des lettres blanches sur fond noir. Adapté de (Champier et al., 2008; Muller et al., 2021a).

La protéine pUL89

La **protéine pUL89** est le produit de l'ORF *UL89* situé sur le segment unique long du génome viral. Cette protéine de 674 acides aminés a un poids moléculaire de 70-75 KDa sous forme monomérique et de 150 KDa sous forme dimérique (Hwang and Bogner, 2002; Scheffczik, 2002; Thoma et al., 2006). Les travaux menés par Davison en 1992 suggèrent pour la première fois l'implication de pUL89 dans le mécanisme d'encapsidation (Davison, 1992; Krosky et al., 1998). Depuis, son implication dans l'encapsidation est confirmée au travers de multiples travaux.

pUL89 est essentielle pour le clivage des concatémères et participe à la reconnaissance et au clivage avec sa partenaire pUL56 (Scheffczik, 2002). Les analyses de séquences en acides aminés ont permis de mettre en évidence 12 régions conservées numérotées de **I** à **XII** avec un polymorphisme naturel distribué entre les positions 200 et 300 et la partie C-terminale (**Figure 21**). Un motif zinc finger de type **CXXH-CXC** est suggéré impliquant les acides aminés **C367, H370, C383, C385**. Quatre motifs typiques des domaines ATPasiques ont été identifiés dont (**I**) un site de liaison de l'adénine (₁₅₆**EPFQ**₁₅₉), (**II**) un motif de type « Walker A » (₂₁₃**PRRHGKT**₂₁₉), (**III**) un motif de type « Walker B » (₃₀₅**LLLVDEAHFI**₃₁₄), et (**IV**) le motif ₃₃₇**SST**₃₃₉ (**Figure 19**) (Champier et al., 2007). Malgré la présence de ces motifs, pUL89 ne présente aucune d'activité ATPasique évidente. Elle possède cependant la capacité de renforcer à hauteur de 30 % celle de pUL56 (Hwang and Bogner, 2002).

pUL89 et pUL56 interagissent par leurs extrémités C-terminales (Hwang and Bogner, 2002). Une séquence de vingt acides aminés (₅₈₀**GRDKALAVEQFISRFNSGYIK**₆₀₀) située dans la région **XI** de pUL89 serait suffisante pour l'interaction entre ces deux protéines (Figure 18) (Thoma et al., 2006). La structure de ce court domaine a été résolue sous forme d'une hélice alpha exposée (Couvreux et al., 2010). La structure cristalline de la région C-terminale de pUL89 a également permis d'identifier trois résidus conservés participant probablement au domaine d'interaction entre pUL89 et pUL56 (**L583, A586 et N595**) (Nadal et al., 2010a).

L'assemblage de ces deux protéines, mené par leur étroite interaction s'effectue dans le cytoplasme pour ensuite rejoindre le noyau grâce au NLS porté par pUL56 (Wang et al., 2012). pUL89 et pUL56 s'accumulent alors dans les centres de réplication en phase tardive post-infection. Seule, la protéine pUL89 n'est pas en mesure de rentrer dans le noyau et se localise dans le cytoplasme (Wang et al., 2012).

Une fois dans les centres de réplifications, le complexe reconnaît spécifiquement les séquences « **pac** » et réalise un premier clivage. La capacité de pUL89 et pUL56 à cliver de

l'ADN sans ces motifs démontre que l'activité enzymatique est aléatoire en condition *in vitro*. Il est admis que pUL56 est incapable d'exercer un clivage spécifique seule et que le clivage spécifique se ferait alors par l'action concertée de pUL89 et pUL56 (Scheffczik, 2002). Les résultats confortant cette hypothèse sont apportés par les données structurales obtenues en 2010 (Nadal et al., 2010a). En effet, l'extrémité C-terminale de pUL89 présente un repliement caractéristique de la superfamille des RNase H-like nucléases et polynucléotidyl-transférases avec trois résidus hautement conservés (**D463**, **Q534**, **D651**) qui coordonnent deux cations Mn²⁺ (Nadal et al., 2010b). Ces résultats ont confirmé que pUL89 possède l'activité nucléasique indispensable à la fonction de la protéine complète. Par ailleurs, les acides aminés conservés **D463** et **R544** ont respectivement été montrés comme essentiels pour l'activité nucléasique et pour la liaison à l'ADN (Theiß et al., 2019)

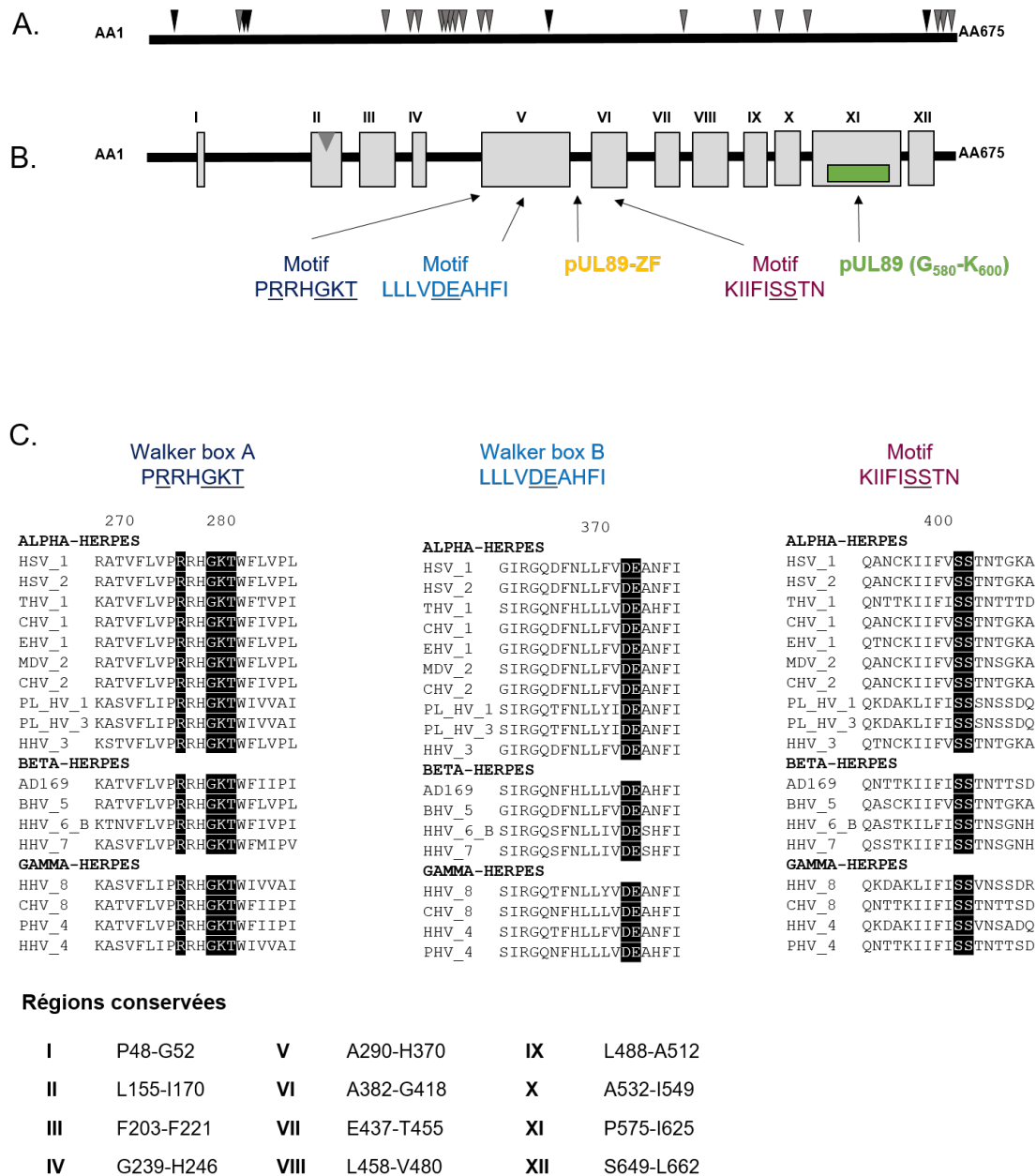


Figure 21 : Structure de pUL89.

A. Distribution du polymorphisme naturel. Les triangles noirs et gris représentent respectivement les mutations retrouvées dans les souches de référence (AD169-Towne-Toledo-Davis) et dans les souches issues de patients naïfs de tout traitement. **B.** pUL89 est composée de 12 régions conservées (I-XII) et comprend des domaines fonctionnels putatifs tels que le domaine doigt de zinc annoté pUL89-ZF et de trois motifs. Les résidus impliqués dans l'interaction avec pUL56 sont représentés en vert. **C.** Alignement des séquences des régions conservées appartenant aux sous-familles α -, β - et γ -herpèsvirus. La numérotation des séquences est conforme à celle des résidus de la souche de référence AD169 du CMVH. Les résidus clés impliqués dans l'activité et la formation des trois motifs sont représentés par des lettres blanches sur fond noir. Adapté de (Champier et al., 2007, p. 200; Muller et al., 2021a)

La protéine pUL51

La **protéine pUL51** est la plus petite du complexe terminase puisqu'elle n'est composée que de 157 acides aminés. Cette protéine essentielle pour le clivage de l'ADN interagit avec les protéines pUL56 et pUL89 (Borst et al., 2013). La partie C-terminale, à elle seule, semble être essentielle pour maintenir l'interaction entre pUL56 et pUL89 écartant, ainsi, l'utilité de la partie N-terminale pour cette fonction (Borst et al., 2013; Neuber et al., 2018). Le remplacement de la protéine pUL51 par son homologue murin M51 ne permet pas de remplacer la fonction de pUL51 malgré un degré de conservation élevé (Neuber et al., 2018). De plus, le déficit de croissance généré par le virus recombinant ne codant que pour la partie C-terminale indique que la partie N-terminale a également un rôle dans le cycle de réplication virale (Neuber et al., 2018). Des régions intrinsèquement désordonnées (IDRs) ont été prédites par analyses *in silico*, ces régions sont notamment connues pour augmenter la stabilité ou pour réguler sa fonction (Faust et al., 2014; Neuber et al., 2018).

En l'absence de ses partenaires, pUL51 est distribuée dans toute la cellule et sa petite taille lui permet de diffuser à travers le complexe du pore nucléaire (Neuber et al., 2017). Cependant pour que le complexe entier (pUL56-pUL89-pUL51) puisse rentrer dans le noyau, sa présence est nécessaire (Neuber et al., 2017). Ces 3 protéines assemblées se protègent mutuellement de la protéolyse, favorisant la stabilité et la persistance du complexe dans les compartiments de réplication (Neuber et al., 2017).

Ainsi, le rôle de pUL51 au sein du complexe terminase semble être celui d'un élément stabilisateur favorisant l'assemblage du complexe.

VI.2. Les protéines partenaires

À ce jour, au moins trois protéines supplémentaires participent au processus d'encapsidation. Il s'agit des protéines pUL52, pUL77 et pUL93. Chacune de ses protéines est décrite dans les paragraphes qui suivent.

La protéine pUL52

La **protéine pUL52** est composée de 668 acides aminés et est conservée chez les herpesvirus (Tableau 6). pUL32, protéine homologue chez l'HSV-1 a davantage été étudiée et a été montrée comme essentielle pour l'étape d'encapsidation et la génération de virion infectieux d'HSV-1 (Chang et al., 1996). Sa localisation dans les compartiments intracellulaires semble dépendre du temps d'infection. En début d'infection, pUL32 s'accumule dans les compartiments de réplication alors que plus tard, la localisation apparaît plus diffuse dans le noyau et le cytoplasme (Lamberti and Weller, 1998). Il a été montré par un test de zinc blot que pUL32 se lie au zinc cependant les acides aminés impliqués dans cette liaison n'ont pas été démontrés (Chang et al., 1996). Curieusement, les motifs de type **CXXC** impliquant des cystéines sont montrés comme essentiels à la réplication virale. Ce type de motif pourrait lier le zinc. Ces résultats de pUL32 suggèrent que cette protéine pourrait être une protéine chaperonne modulant la formation de liaisons disulfures pendant l'assemblage et la maturation de la procapside (Albright et al., 2015).

Les études sur pUL52, majoritairement conduites par Borst, ont montré que cette protéine n'a pas d'impact sur la réplication de l'ADN viral. En revanche elle est nécessaire pour son clivage. En son absence, des capsides de type A et B sont générées ; ainsi, pUL52 n'est pas essentielle pour la formation de capsides, mais l'est pour l'obtention de capside C. Enfin, pUL52 ne semble pas être impliquée dans la localisation nucléaire du complexe terminase (Borst et al., 2008) ni dans les interactions entre les protéines du complexe terminase (pUL56 – pUL89 – pUL51) (Elbasani et al., 2014).

Contrairement à pUL32 chez l'HSV-1, les études de localisation de pUL52 n'ont pas révélé un mode de localisation dynamique. pUL52 a été localisée dans le noyau autour des compartiments contenant pUL56, avec une certaine colocalisation en périphérie de ces compartiments. Un NLS putatif impliquant les acides aminés ³¹⁵**PYNKPRR**₃₂₁ suggère que pUL52 est activement importée dans le noyau (Borst et al., 2008). La partie C-terminale de pUL52 semble être cruciale pour sa fonction puisque la génération de virus recombinants codant pour une version de pUL52 étiquetée en C-terminale n'induit pas de réplication virale.

La protéine pUL52, peu étudiée à ce jour, fera l'objet d'un travail spécifique au sein de cette thèse.

Les protéines pUL77 et pUL93

Les **protéines pUL77 et pUL93** sont toutes deux des protéines essentielles à la réplication virale (DeRussy and Tandon, 2015). En leur absence, le clivage des concatémères ne se produit pas et seules des capsides B sont générées ce qui suggère leur implication dans l'étape d'encapsidation.

La protéine pUL77, composée de 642 acides aminés interagirait avec de nombreuses protéines impliquées dans la formation de la capside, telle que la MCP, la protéine tégumentaire pUL71, pUL93, le portail, l'ADN, ou encore le complexe terminase (Borst et al., 2016). Bien que son rôle n'ait pas encore été élucidé, cette protéine participe à la stabilité de la capside entière et joue un rôle clé pendant la formation de la capside virale (Meissner et al., 2012, 2011). De plus, son homologue pUL25 d'HSV-1 semble également être nécessaire pour maintenir la stabilité de la capside et de multiples interactions ont également été mises en évidence (Cockrell et al., 2011).

pUL93 interagit avec pUL77 et les composants du complexe de sortie nucléaire (pUL50-pUL53-pUL97) (DeRussy et al., 2016). L'interaction entre pUL93 et pUL77 est également retrouvée chez l'HSV-1 avec les deux homologues à savoir pUL17 et pUL25 (Tableau 6). pUL93, protéine composée de 594 résidus, semble jouer un rôle clé lors de la formation de la capside virale (DeRussy et al., 2016; DeRussy and Tandon, 2015; Köppen-Rung et al., 2016). Il a d'ailleurs été démontré que son homologue chez HSV-1, pUL17, ancre le complexe terminase à la capside et est impliqué dans la détermination du site de clivage de l'ADN (Muller et al., 2021a).

Bien que ces protéines jouent un rôle dans l'étape d'encapsidation, leur fonction exacte reste à être élucidée.

VI.3. Mécanisme d'encapsidation chez les herpèsvirus

L'étape d'encapsidation se déroulerait comme suit ; une fois l'ADN viral synthétisé sous forme d'unités génomiques successives, le complexe terminase reconnaît **spécifiquement** les motifs « *pac* » contenus dans les séquences « *a* » des segments IRL et TRL et effectue un **premier clivage** générant ainsi des extrémités libres initiant l'encapsidation.

Ce complexe se fixe en parallèle aux protéines composant le portail d'une procapside jusqu'à ce que l'ADN soit entièrement encapsidé. Cette étape s'achève par un **second clivage** au niveau du portail quand une unité génomique est intégrée. A ce même moment les protéines « *scaffold* » sont dégradées et la capside s'angularise. Finalement, le complexe formé entre l'ADN et les terminases se dissocie de la capside pleine. Le complexe terminase se prépare ensuite pour la prochaine encapsidation.

La résolution tridimensionnelle de la structure du complexe terminase de l'HSV-1 (PDB : 6M5R) est une avancée majeure sur la compréhension de l'étape d'encapsidation chez les herpèsvirus. Les interactions fortes décrites entre les protéines pUL56, pUL89 et pUL51 sont également retrouvées chez les homologues pUL28, pUL15 et pUL33 de l'HSV-1 davantage étudiés (Tableau 6). La **figure 22** présente la structure tridimensionnelle du complexe assemblé ou non sous forme hexamérique (**Figure 22, A et B**). Il est montré que le canal central de la structure hexamérique possède un diamètre interne de 39 Å suffisant pour lier et transloquer l'ADN (Wang et al., 2020; Yang et al., 2020).

Les domaines protéiques impliqués dans l'activité ATPasique du complexe terminase de l'HSV-1 se situent à l'intérieur du canal central et agissent comme un moteur pour « pousser » l'ADN dans la procapside (**Figure 22, C et D**). De la même manière, les domaines impliqués dans l'activité nucléasique se situent également à ce niveau (**Figure 22, C et D**).

Après la reconnaissance, la fixation spécifique au génome viral et à la protéine portail (HSV-1 pUL6), la translocation de l'ADN peut commencer. Durant cette phase, les domaines protéiques impliqués dans l'activité ATPasique sont au contact de l'ADN, *a contrario*, les domaines liés à l'activité nucléase sont écartés de l'ADN limitant ainsi un clivage prématuré. À la fin de l'encapsidation, un réarrangement du domaine lié à l'activité nucléase est engagé par les domaines régulateurs de pUL15 ce qui permettrait la conversion du complexe terminase en phase de clivage (Yang et al., 2020). Ainsi les domaines nucléasiques seraient en contact avec l'ADN et pourraient exercer le clivage (**Figure 22**).

Cette première structure atomique d'un complexe terminase d'un herpèsvirus fournit un modèle très intéressant pour la compréhension du mécanisme et pour les futures études

sur le mode d'action des molécules antivirales. Elle contribuera également aux efforts de développement de meilleurs inhibiteurs de terminase utilisables dans les infections dues aux herpèsvirus.

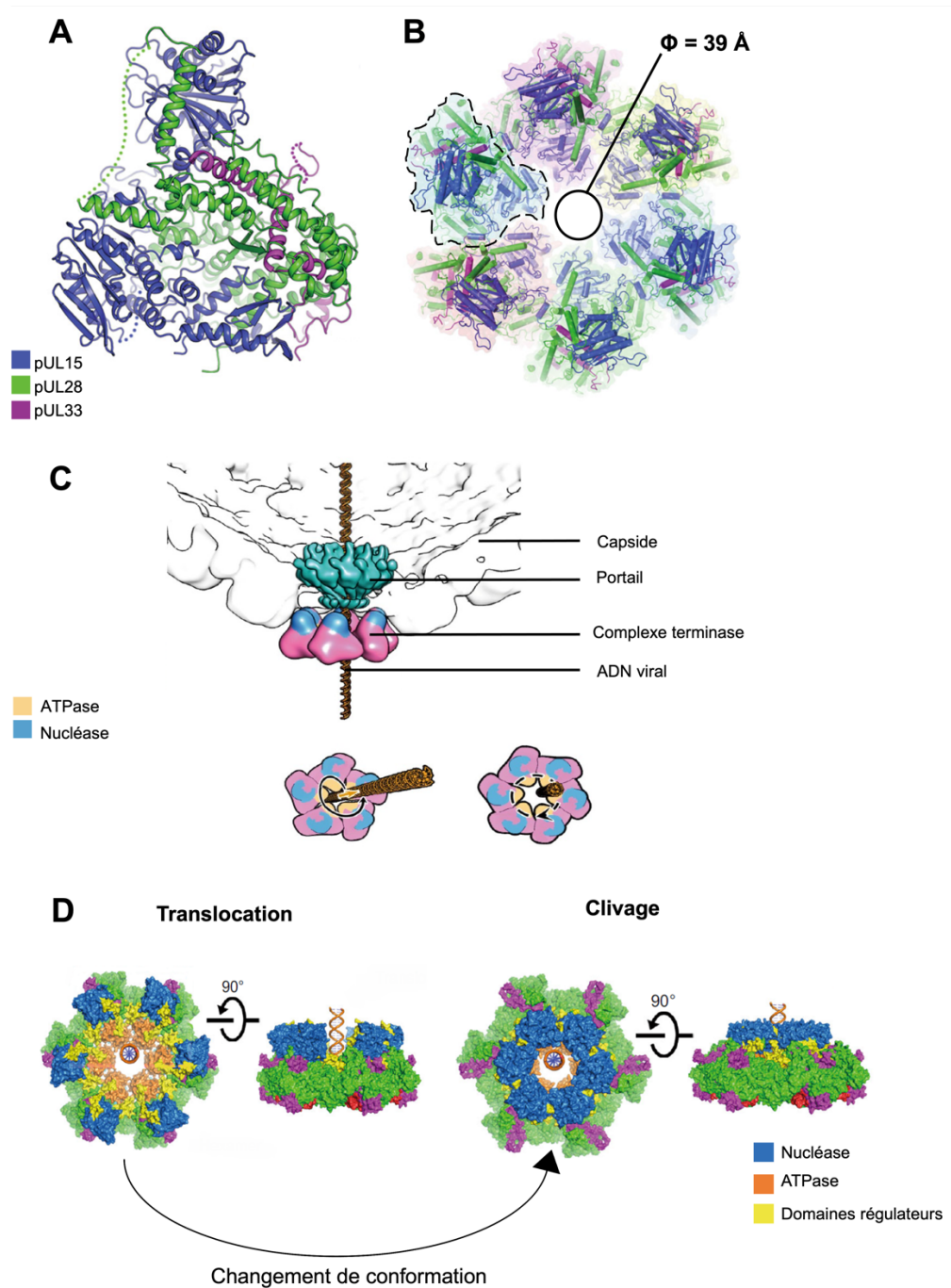


Figure 22 : Structure atomique du complexe terminase de l'HSV-1.

A. Structure atomique du complexe terminase (pUL15-pUL28-pUL33). **B.** Assemblage sous forme hexamérique. **C.** place du complexe terminase dans l'encapsidation. **D.** Changement de conformation du complexe lors de l'encapsidation de l'ADN. Adapté de (Yang et al., 2020).

OBJECTIFS DE L'ÉTUDE

Le CMVH présente un problème majeur de santé publique. Il s'agit un agent pathogène opportuniste rencontré chez les sujets immunodéprimés, mais aussi chez le fœtus puisqu'il représente la première cause d'infection congénitale d'origine virale. Les traitements conventionnels sont des molécules antivirales ciblant la polymérase virale pUL54. Malgré leur efficacité, leur toxicité et l'émergence de résistances entraînent des défis thérapeutiques. Face à ces constats, il est nécessaire de développer de nouvelles thérapies ciblant d'autres étapes du cycle réplcatif.

L'étape d'encapsidation de l'ADN viral est une étape essentielle à la réplication du CMVH. Les protéines impliquées sont des cibles thérapeutiques privilégiées par le degré de conservation et de spécificité chez les herpesvirus. Le développement récent du letermovir conforte ce choix, cependant son mécanisme d'action exacte demeure inconnu et devant l'émergence de mutations à haut niveau de résistance il convient d'identifier de nouvelles cibles thérapeutiques pour développer de nouveaux candidats-médicaments.

La première partie de ce travail porte sur **l'étude de l'implication de la protéine pUL51 dans la résistance au letermovir.**

Les principales mutations conférant une résistance au letermovir sont situées dans les gènes codant pUL56 et pUL89. Avec la caractérisation *in vitro* de la mutation P91S dans pUL51, l'hypothèse du mécanisme d'action évolue et suggère que le letermovir inhibe une fonction biologique nécessitant l'interaction des trois protéines pUL56-pUL89-pUL51. Dans cette partie, nous décrivons la première mutation de résistance dans pUL51 issue d'une souche clinique avec une meilleure compréhension du potentiel mode d'action du letermovir grâce au modèle structural du complexe terminase de l'HSV-1.

La deuxième partie de ce travail de thèse se concentre sur **l'identification de nouvelles cibles thérapeutiques** dans les protéines pUL51 et pUL52 en **vue du développement de nouvelles thérapies.**

À partir d'une approche informatique (alignements de séquences et modélisations protéiques principalement) puis expérimentale (production de virus recombinants), des domaines fonctionnels essentiels ont été identifiés comme de potentielles cibles thérapeutiques. La validation de cibles thérapeutiques est effectuée par le développement de peptides mimant une partie de la structure de la protéine-cible.

Enfin la dernière partie de ce travail a pour objectif de mieux **comprendre le fonctionnement du complexe terminase** et d'explorer le **mécanisme d'action du letermovir**. Celui-ci n'étant toujours pas clairement établi, nous nous sommes attelés à la production des protéines recombinantes pUL56 et pUL89 afin d'effectuer des tests d'interaction en présence de cette molécule.

ÉTUDE EXPERIMENTALE

PARTIE 1 : Implication de la protéine pUL51 dans la résistance au letermovir

Malgré sa petite taille (157 acides aminés), pUL51 est essentielle pour la réplication virale et pour le fonctionnement du complexe terminase. D'après les données disponibles dans la littérature, le rôle de pUL51 serait celui d'un élément stabilisateur favorisant l'assemblage du complexe.

Le premier travail sur cette protéine porte sur l'étude de son **implication dans le mécanisme de résistance au letermovir**.

Le letermovir est une molécule ciblant l'étape d'encapsidation de l'ADN viral. Son mécanisme d'action n'est pas totalement compris, mais l'apparition de mutations de résistance est en faveur de l'implication des protéines pUL56, pUL89 et plus récemment de la protéine pUL51. La majeure partie des mutations de résistance sont localisées dans la protéine pUL56 et certaines d'entre elles sont retrouvées dans les souches cliniques. Suite à des expériences de sélection *in vitro* en présence de letermovir des mutations de résistance ont émergées dans les gènes codant pUL89 et pUL51. À ce jour, une seule mutation a été décrite dans pUL51, il s'agit d'une substitution de la proline en position 91 en sérine (Chou, 2017). Cette mutation confère une résistance modeste au letermovir, mais en combinaison avec d'autres mutations dans pUL56, le niveau de résistance est beaucoup plus élevé (**Tableau 7**) (Chou, 2017). Par ailleurs, cette mutation n'a jamais été retrouvée dans des souches cliniques.

Tableau 7 : Génotypes et phénotypes des virus recombinants.

Souche	Génotype		EC50 (nM)			
	UL51	UL56	letermovir			
			Moyenne	Écart-type	N ¹	Ratio ²
AD169	WT	WT	3,7	0,77	79	
AD169	P91S	WT	7,6	1,7	43	2,1
AD169	P91S	S229F	23	3,3	10	6,3
AD169	P91S	S229F, L254F, L257I	1060	137	12	290

¹ Nombre de réplicats, ² Rapports des valeurs EC50 à celles de la souche témoin sauvage AD169 WT, (Chou, 2017).

Ainsi cette étude porte sur le suivi par séquençage de 16 patients traités par du letermovir en raison de leur non-réponse au traitement par anti-polymérase. La comparaison des substitutions du gène *UL51* trouvées chez ces patients avec le polymorphisme naturel de ce gène (déterminé parallèlement par le séquençage de 56 souches naïves) nous a permis

d'identifier 4 substitutions potentiellement impliquées dans la résistance au letermovir ; **D12E, 17del, A95V et V113L**.

Des virus recombinants portant ces substitutions ont été construits pour la méthode des BAC (*Bacterial Artificial Chromosome*) pour évaluer leur implication sur la réplication virale et la résistance au letermovir. Après analyse phénotypique des virus recombinants, seule la substitution **A95V** confère une résistance au letermovir avec un EC50 de $29,246 \pm 0,788$ nM. La souche de ce patient porte également une mutation de résistance (L257I), déjà décrite, dans pUL56. Cette mutation confère un niveau de résistance intermédiaire au letermovir avec un EC50 d'environ 30 nM et semble altérer légèrement la croissance virale (Chou, 2017). Le virus recombinant portant ces deux mutations de résistance possède un EC50 de $271,39 \pm 41,05$ nM soit, confère une résistance 128 fois plus importante par rapport à la souche sauvage.

Récemment, le complexe terminase de l'HSV-1 a été résolu en CryoEM (Yang et al., 2020). Nous avons localisé les mutations de résistance de pUL56, pUL89 et pUL51 dans leurs homologues (pUL28, pUL15 et pUL33). Ces mutations de résistance sont situées dans une région spatiale restreinte. Il semblerait donc que le letermovir pourrait impacter cette région du complexe terminase.

Ainsi pour la première fois, nous avons émis l'hypothèse que le letermovir se fixe dans une poche catalytique similaire à celle existante dans le complexe terminase de l'HSV-1. Néanmoins, des différences d'acides aminés entre les séquences du CMVH et de l'HSV-1 pourraient expliquer l'absence d'efficacité du letermovir vis-à-vis de l'HSV1.

Ce travail a fait l'objet d'une **communication orale** (congrès international), deux communications sous forme **de poster** (congrès internationaux) et d'un **article dans le journal *Antiviral Research* en 2022**.



Contents lists available at ScienceDirect

Antiviral Research

journal homepage: www.elsevier.com/locate/antiviral

First clinical description of letermovir resistance mutation in cytomegalovirus *UL51* gene and potential impact on the terminase complex structure

Clotilde Muller^{a,*}, Valentin Tilloy^{b,c}, Emilie Frobert^d, Linda Feghoul^e, Isabelle Garrigue^f, Quentin Lepiller^g, Audrey Mirand^h, Egor Sidorov^b, Sébastien Hantz^{a,b,1}, Sophie Alain^{a,b,**,1}

^a Univ. Limoges, INSERM, CHU Limoges, RESINFIT, U1092, F-87000, Limoges, France

^b CHU Limoges, Laboratoire de Bactériologie-Virologie-Hygiène, National Reference Center for Herpesviruses (NRCHV), F-87000, Limoges, France

^c CHU Limoges, UF9481 Bioinformatique, F-87000, Limoges, France

^d CHU Lyon, UCL, Virology Department, Lyon, France

^e CHU Saint Louis, AP-HP, Virology Department, Paris, France

^f CHU Pellegrin, Virology Department, Bordeaux, France

^g CHU Besançon, Virology Department, Besançon, France

^h CHU Clermont-Ferrand, Virology Department, Clermont-Ferrand, France

ARTICLE INFO

Keywords:

Cytomegalovirus
Herpes simplex
Letermovir
Resistance
Terminase
UL51

ABSTRACT

Background: Letermovir (LMV) is a human cytomegalovirus (HCMV) terminase inhibitor indicated as prophylaxis for HCMV-positive stem-cell recipients. Its mechanism of action involves at least the viral terminase proteins pUL56, pUL89 and pUL51. Despite its efficiency, resistance mutations were characterized *in vitro* and *in vivo*, largely focused on pUL56. To date, mutations in pUL51 in clinical resistance remain to be demonstrated.

Methods: The pUL51 natural polymorphism was described by sequencing 54 LMV-naïve strains and was compared to *UL51* HCMV genes from 16 patients non-responding to LMV therapy (prophylaxis or curative). Recombinant viruses were built by *«en-passant»* mutagenesis to measure the impact of the new mutations on antiviral activity and viral growth. Structure prediction was performed by homology modeling. The pUL51 final-model was analyzed and aligned with the atomic coordinates of the monomeric HSV-1 terminase complex (PDB: 6M5R).

Results: Among the 16 strains from treated-patients with LMV, 4 never described substitutions in pUL51 (D12E, I7del, A95V, V113L) were highlighted. These substitutions had no impact on viral fitness. Only UL51-A95V conferred 13.8-fold increased LMV resistance level by itself (IC₅₀ = 29.246 ± 0.788).

Conclusion: As an isolated mutation in pUL51 in a clinical isolate can lead to LMV resistance, genotyping for resistance should involve sequencing of the pUL51, pUL56 and pUL89 genes. With terminase modelling, we make the hypothesis that LMV could bind to domains were UL56-L257I and UL51-A95V mutations were localized.

1. Introduction

Human cytomegalovirus (HCMV) can cause severe complications in immunocompromised patients. The antiviral molecules used against HCMV infection are mainly viral DNA polymerase (pUL54) inhibitors such as, ganciclovir and its prodrug, valganciclovir, cidofovir and foscarnet. The letermovir (LMV) acts via a novel, not fully understood,

mechanism involving at least the viral terminase proteins pUL56, pUL89 and pUL51 and therefore offers a different mode of action than anti-polymerase (Ligat et al., 2018; Lischka et al., 2010). Recently recommended as prophylaxis for HCMV infection in high-risk hematopoietic stem cell (HSC) recipients, LMV is occasionally used to treat refractory HCMV infections (Linder et al., 2021; Schubert et al., 2021). Despite its efficiency, resistance mutations were characterized *in vitro* and *in vivo*

* Corresponding author.

** Corresponding author. Univ. Limoges, INSERM, CHU Limoges, RESINFIT, U1092, F-87000 Limoges, France.

E-mail addresses: clotilde.muller@unilim.fr (C. Muller), sophie.alain@unilim.fr (S. Alain).

¹ S Hantz and S Alain: equal contribution as co-last author.

<https://doi.org/10.1016/j.antiviral.2022.105361>

Received 31 March 2022; Received in revised form 31 May 2022; Accepted 6 June 2022

Available online 9 June 2022

0166-3542/© 2022 Elsevier B.V. All rights reserved.

(Alain et al., 2020; Chou, 2020; Piret and Boivin, 2019). They are largely focused on the protein pUL56 of the terminase complex (Goldner et al., 2011). However, *in vitro* selection experiment with LMV showed the occasional emergence of pUL89 mutations that confer cross-resistance (Chou, 2015). Only one mutation, P91S, was described in the terminase subunit pUL51 by *in vitro* drug selection experiments with LMV (Chou, 2017). To date, this mutation was not found in clinical setting. Samples from patients non-responding to LMV therapy are sent to the National Reference Center (NRC) for Herpesviruses in France for sequencing *UL56*, *UL89*, *UL51* genes. We reported here the results for 16 LMV-treated patients. By comparison with the *UL51* natural polymorphism obtained after sequencing naïve strains from our collection, we highlighted 4 never described substitutions in pUL51 (D12E, 17del, A95V, V113L). Among them, we report the first resistance mutation described in a clinical sample from a patient under LMV prophylaxis. To better understand the role of pUL51 in the terminase complex, we defined essential domains by analyzing the pUL51 polymorphism, doing sequence alignments and protein modelling. Moreover, the putative LMV interaction with the terminase complex partners is presented here by analogy with the terminase complex of Herpes Simplex Virus type 1 (HSV-1) (Yang et al., 2020).

2. Materials and methods

2.1. HCMV strains and isolates

Five reference strains – AD169 (ATCC VR-538), Davis (ATCC VR-807), Towne (ATCC VR-977) Merlin (AY446894.2) and Toledo (GU937742.2) and 72 HCMV DNA samples obtained from clinical

isolates or blood samples were analyzed. We included 56 samples from LMV-naïve patients and all the 16 samples from LMV-treated patients collected from 2015 to 2021 in various French hospitals. The 16 blood/plasma samples came from patients receiving LMV in prophylaxis or curative treatment following HSC or solid organ transplantation. They were all sent to the NRC for resistance genotyping. Their viral loads were comprised between 3 and 4.53 log IU.mL⁻¹ (median: 3.53; mean: 3.63; SD: ±0.4).

2.2. Amplification and sequencing of *UL56/UL89/UL51* genes from clinical strains

2.2.1. Amplification by nested PCR and Sanger sequencing

The full-length *UL51*, *UL56* and *UL89* genes of all clinical samples were amplified, sequenced and analyzed as previously described for *UL56* and *UL89* (Champier et al., 2007, 2008). Table S1 summarizes the primers and reagents used for amplification and sequencing.

2.2.2. Next generation sequencing and data analysis

UL51 gene coding sequence was amplified by nested PCR for 24 clinical samples from naïve patients and 16 from LMV-treated patients. Viral DNA was isolated from the 32 clinical isolates by the Hirt method (Hirt, 1967). The flowchart of the experiments is presented in Fig. 1. A depletion of human DNA was then performed using the NEBNextR Microbiome DNA Enrichment kit (New England Biolabs, Ipswich, USA). Before analysis, all DNAs were purified using magnetic beads (Agencourt AMPure XP) and fragmented using the Ion Xpress Plus DNA Fragment Library Preparation kit (ThermoFisher Scientific, Waltham, USA). Barcodes adapters were ligated to fragment ends and 250 bp

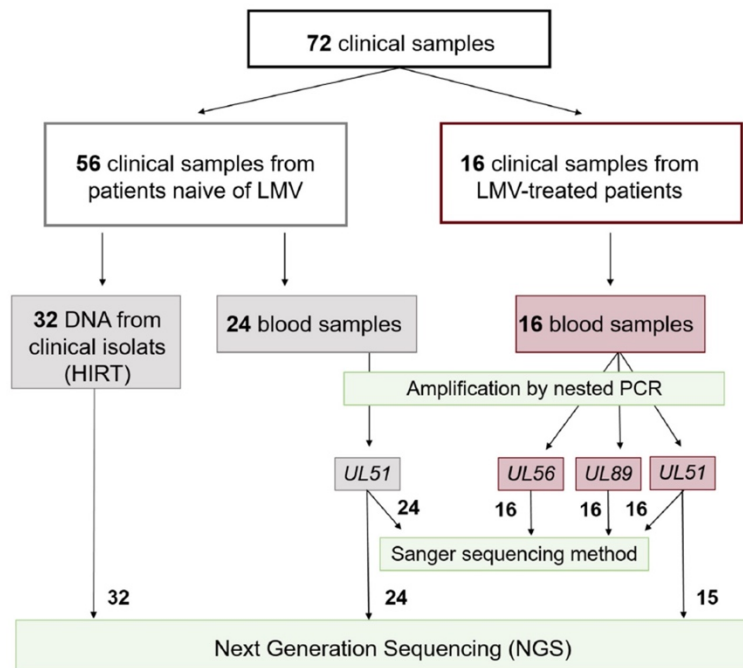


Fig. 1. Flow chart of the sequencing analysis. 56 (32 + 24) clinical samples came from patients naive of LMV (either congenitally infected newborns or immunocompromised patients) and 16 clinical samples from LMV non responding patients. *UL51* sequences amplified by nested PCR were sequenced by both Sanger and NGS. LMV: letermovir, PCR: polymerase chain reaction.

fragments were collected. Libraries were PCR amplified, then sequenced either on Ion Proton or S5 machine using Ion Sequencing kit (ThermoFisher Scientific, Waltham, USA). Ubam files from Ion Torrent were converted into fastq using bamtools 2.4.1. Quality check of raw-reads was performed using FastQC v0.11.5 and MultiQC v0.9. A trimming step using Trimmomatic-0.39 was then done using low stringency parameters (phred33 LEADING:3 TRAILING:3 SLIDINGWINDOW:4:15 MINLEN:36 options). Those reads were then validated using the previous quality check step. Trimmed reads were then aligned against *UL51* sequence exacted from Merlin reference strain (AY446894.2) using BWA-MEM algorithm from Bwa 0.7.17-r1188 and Samtools 1.9 (view, sort and index options). Genetics variations from alignment were called using Lofreq 2.1.3.1. Mutations were then filtered using Bcftools 1.8 based on phred score (200) and depth (100). A filter selecting mutations above 2% allelic frequency was also applied. Consensus files were obtained from VCF files using Bcftools 1.8 (consensus) and formatted using awk custom commands. GenBank accession numbers of the *UL51* sequences range from ON505076 to ON505147.

2.3. Polymorphism and heatmap generation

The binary heatmap provides a data matrix where the colors give an overview of mutational differences between strains. Briefly, the strains groups were extracted from the base dataset and each mutation is recorded in a dummy variable. The base dataset is converted into a 2-dimensional matrix (x, y) with y ordered by the strain and x by the amino acids id. The binary heatmap is plotted showing mutations in saddle brown and absence of a mutation in peach puff. Python 3.9.6 engine is used to generate this binary heatmap (Muller et al., 2021).

2.4. Bacmid recombinant virus assay for characterization of unknown mutations

2.4.1. Cells and bacterial strains

Human fibroblasts MRC-5 (bioMérieux, Marcy l'Etoile, France) were cultivated as previously described (Jacquet et al., 2020). *Escherichia coli* strain GS1783 was used for BAC mutagenesis Bacterial Artificial Chromosome (Borst et al., 1999). The HCMV-BAC contains an enhanced green fluorescent protein (EGFP) gene in the unique short region and was derived from parental strain pHB5, the BAC-cloned genome of the HCMV laboratory strain AD169 (Chee et al., 1990) (gift from M. Messerle, Hanover Medical School, Germany).

2.4.2. Antiviral compound

Letermovir was purchased from MedChemExpress (HY-15233), reconstituted in DMSO at 10 mM and stored at -80°C . For antiviral assays, LMV was diluted in cell medium to obtain a final concentration of 40 nM before making serial $\frac{1}{2}$ dilutions down to 1.25 nM. Resistant strains were then tested with a concentration range from 10 μM to 10 nM while keeping final DMSO concentrations below 0.1%.

2.4.3. Bacterial Artificial Chromosome mutagenesis

UL51 and *UL56* mutations were introduced by "en passant" mutagenesis into the EGFP-expressing HCMV-BAC and confirmed by sequencing as previously described (Andouard et al., 2016). Primers for mutagenesis are described in Supplementary Table S2.

2.4.4. Antiviral assays and growth curve analysis

Focus reduction assay in 48-well plates was used to assess antiviral susceptibilities to LMV of each mutant as previously described (Jacquet et al., 2020). At least 3 antiviral assays replicates were performed in triplicate for the reference strain AD169 and each mutant HCMV-BAC. The EC50 was determined from EC50 Calculator from AAT Bioquest (<https://www.aatbio.com/tools/ic50-calculator>). To estimate the impact of each mutation on viral fitness, the recombinant strain and AD169-WT (wild control) were inoculated in 48-well MRC-5 culture at a

multiplicity of infection (MOI) of 0.01. From day 1 to day 7 post-inoculation, number of fluorescent cytopathic foci was counted to establish viral growth curves for each recombinant.

2.5. Identification of conserved patterns and structure prediction

2.5.1. Conserved patterns

The pUL51 amino acids sequence of HCMV reference strain AD169 was first aligned with the homologous proteins from 6 human herpesviruses and then with the sequences of 8 homologous proteins from other beta-herpesviruses, as described in Table S3. Alignments were performed using Clustal Omega multiple sequence alignment (MSA) tools provided by the EMBL-EBI bioinformatics web and programmatic tools framework (Li et al., 2015; McWilliam et al., 2013; Sievers et al., 2011). User-identified structural templates selected from the Protein Data Base (PDB) were used to construct full-length atomic models by iterative template fragment assembly simulations (I-TASSER Protein Structure and Function Prediction program) (Roy et al., 2010; Yang et al., 2015; Yang and Zhang, 2015). Target function was predicted by threading the 3D model through a protein function database. The amino acid sequence of pUL51 HCMV (P16792.1) was submitted and the final model with the higher confidence score (c-score) was analyzed using VMD 1.9.4 (Visual Molecular Dynamics).

2.5.2. Tridimensional structure alignment

The atomic coordinates of the monomeric HSV-1 terminase complex (PDB: 6M5R) are separated in 3 chains. Chain A corresponds to pUL15 from amino acid T35 to T727, chain B to pUL28 from amino acid A2 to R775 and chain C to pUL33 from amino acid T12 to R129. Atomic coordinates of the chain C were extracted from the text file (PDB: 6M5R) with notepad++ (8.1.9.) and were saved in a new file (.txt). The HCMV-pUL51 modelling structure and the new file containing atomic positions of pUL33 from amino acid T12 to R129 were both imported in VMD 1.9.4. Analyses were performed using "MultiSeq" analyses. From "Sequence Alignment" function, structures were aligned with "Stamp Structural Alignment". Both structures are represented with the drawing method "NewCartoon". Root Mean Square Deviation (RMSD) score of atomic position was analyzed in Excel (Fig. S1). In the same way, HCMV-pUL51 modelling structure was aligned with HSV-1 pUL33 structure in the whole HSV-1 terminase complex (PDB: 6M5R). The Chain C of HSV-1 terminase complex was selected to do "Sequence alignment" and "Stamp Structural Alignment".

3. Results

3.1. Identification of polymorphisms

The *UL51* sequencing results of reference strains AD169, Towne and Toledo were identical to the sequences found in the GenBank (accession number FJ527563.1, GQ121041.1, GU937742) by both methods used (Sanger and NGS). Thus, inter-assay reproducibility was 100%. Among the 56 LMV-naïve strains, 14 amino acid polymorphisms were distributed across pUL51 (Fig. 2). Only one substitution (S153P) was also present in the reference strains Towne, Toledo, Davis and Merlin but not in AD169. The main identity of the HCMV isolates was 98.96% (range 97.45%–100%) and the mean number of polymorphisms per isolates was 1.6 (range 0–4). Analysis of polymorphisms repartition through pUL51 revealed a huge concentration of amino acid substitution in a N-terminal part. Single nucleotide polymorphisms (SNPs) of 56 LMV-naïve strains did not concern the C-terminal part except for the S153P substitution found also in reference strains Towne, Toledo, Davis and Merlin. Among the 16 LMV-treated samples, 15 were sequenced by NGS method. For the remaining sample which had a low DNA concentration, only the Sanger sequence was used (Fig. 1). Eight SNPs were found: 1 was common to reference strains (S153P), 3 to LMV-naïve strains (A4T, G16A, Q23K) and 4 had never been described (D12E; 17del; A95V;

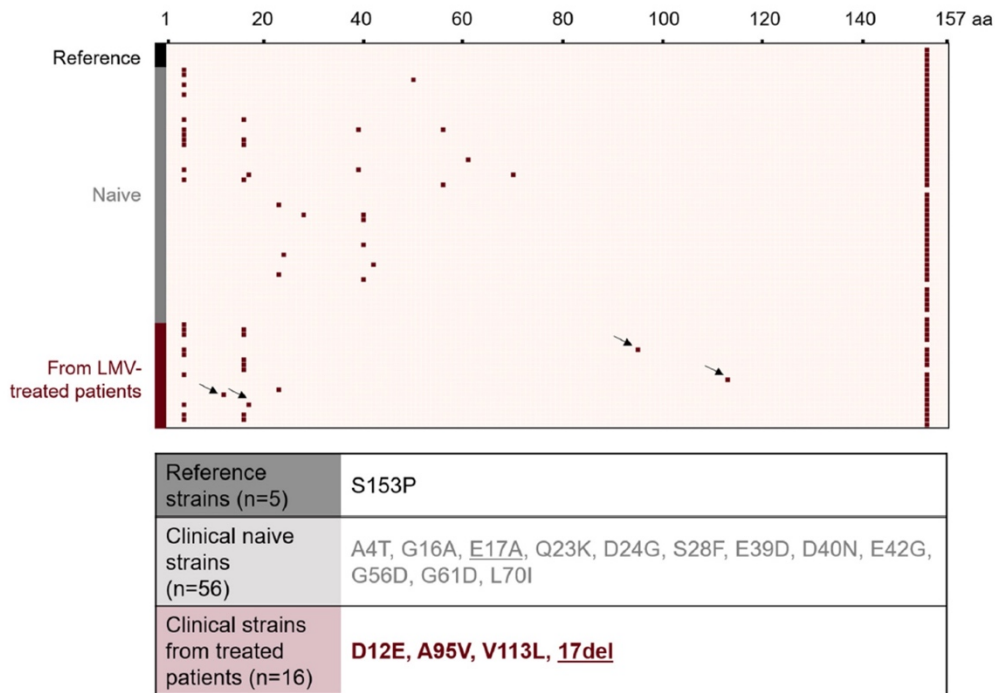


Fig. 2. Polymorphism distribution of HCMV pUL51. (A) Representation through a binary heatmap of the polymorphism distribution according to the strain and the position of the mutation in pUL51. The 3 groups studied (reference strains (n = 5), naïve strains (n = 54) and strains from patients treated with LMV (n = 16) are represented by black, grey and saddle brown, respectively, in the y axis. Mutations are shown in saddle brown and the absence of a mutation in peach puff. (B) Description of the polymorphism mutation depending on the group. LMV: letermovir; aa: amino acids.

V113L). D12E and 17del are in the high natural polymorphism part; A95V and V113L substitutions are in a polymorphism-free part. These 4 residues were found in samples collected from 4 different patients. The patient’s sample harboring the A95V substitution on pUL51 has the L257I substitution in pUL56. This patient was a stem cell recipient and developed HCMV reactivation under LMV-prophylaxis. Both patient’s samples harboring the D12E or V113L substitutions on pUL51 have respectively the C325F or C325Y substitution in pUL56. At least, the patient’s sample harboring the 17del in pUL51 was not associated with any mutation in pUL56. UL89 gene sequences of these four patient’s samples were similar to the reference strain (Table 1).

3.2. Phenotypic characterization of newly detected mutations

Genotypes and phenotypes of recombinant-viruses representing the

Table 1 Characteristics of the clinical samples.

Accession numbers	UL56	UL89	UL51	Transplant	Treatment	Viral loads (log UL mL ⁻¹)
ONS05132	L257I	WT	A95V	HSC	LMV prophylaxis	3.21
ONS05138	C325Y	WT	V113L	HSC	LMV prophylaxis	3.12
ONS05141	C325F	WT	D12E	Kidney	LMV curative	3.40
ONS05147	WT	WT	del17	Lungs	LMV curative	5.40

newly detected mutations are summarized in Table 2. The UL51 D12E, 17del and V113L mutations did not confer resistance to LMV, while UL51-A95V confers a 13.8-fold increase of the EC50 of LMV (EC50 = 29.246 ± 0.788). Double mutants were constructed according patient’s samples genotyping (Table 1) to study the effect of the UL51 substitutions in combination with UL56 substitutions (Table 2). Results indicated that the combined mutations UL51-A95V and UL56-L257I confers a 127.7-fold increase LMV resistance (EC50 = 271.39 ± 41.05). For both double mutants UL51-D12E/UL56-C325F and UL51-V113L/UL56-C325W the EC50 is greater than 10 µM (Table 2).

Table 2 Effective Concentration 50% of viral growth (EC50) obtained for the recombinant viruses.

Strains	Genotype		EC50 nM			
	UL51	UL56	LMV			
			Mean	SD ^a	N ^b	Ratio ^c
AD169	WT	WT	2.123	0.633	7	1.0
AD169	D12E	WT	3.018	0.373	3	1.4
AD169	17del	WT	2.878	0.339	3	1,3
AD169	A95V	WT	29.246	0.788	4	13.8
AD169	V113L	WT	3.206	0.453	4	1.5
AD169	D12E	C325F	>3000	/	4	
AD169	A95V	L257I	271.39	41.05	5	127.8
AD169	V113L	C325Y	>3000	/	3	

^a Standard deviation of EC50 values.
^b Number of replicates of testing in triplicates (over at least 3 separate dates).
^c Ratio of EC50 value to that of wild type control strain.

3.3. Effect of mutations on viral growth

The assessment of the impact on viral fitness of each mutation was compared with the parental strain AD169-WT. Mutations in recombinant viruses had no significant impact on viral fitness except for the double AD169 UL51-A95V/UL56-L257I (Fig. 3).

3.4. Identification of conserved regions

Alignment of 6 human herpesviruses pUL51 homologs (Table S3) allows to highlight 2 parts in the protein; the N-terminal side which does not seem to be conserved and the C-terminal side showing a higher degree of conservation (Fig. 4, A). To further determine conserved regions, homologs of HCMV pUL51 protein were studied in 8 beta-herpesviruses (Table S3). Amino acids alignment shows 37 residues as

strictly similar, 25 strongly similar and 5 weakly similar. All conserved residues are found in the C-terminal part of the sequence alignments from amino acid Y86 to E148 (Fig. 4, B). The resistance mutation UL51-A95V affects a strictly conserved residue of the conserved part in both human and beta-herpesviruses alignments. N-terminal part shows gaps or variability between residues, which is characteristic of a variable region.

3.5. Tridimensional modelling of pUL51 and alignment with pUL33 from the terminase complex of HSV-1

To identify the tridimensional amino acids position, protein modelling was performed with I-TASSER. The predicted secondary structure is mainly composed of helices on the C-terminal part. The N-terminal part is mostly composed of coils, with some helices. The I-TASSER report

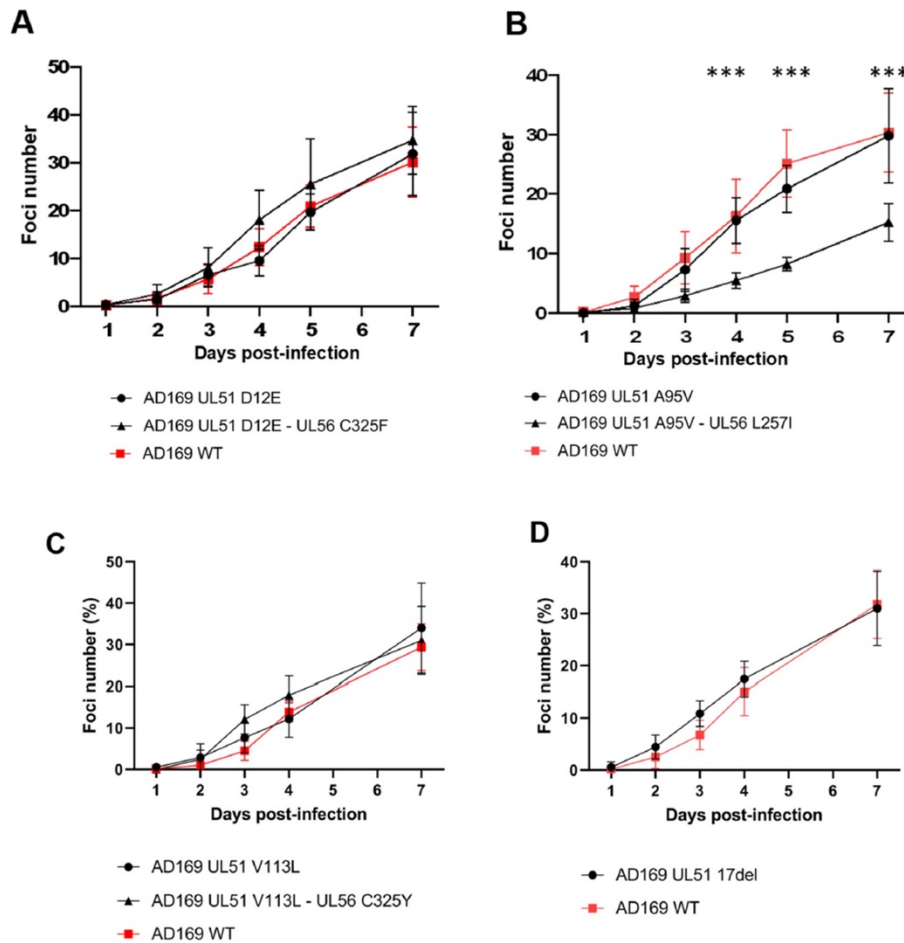


Fig. 3. Growth curves analysis of the recombinant viruses. (A) Growth curves of the recombinant virus strain AD169 UL51 D12E and AD169 UL51 D12E-UL56 C325F in comparison to the parental strain AD169 WT. (B) Growth curves of the recombinant virus strain AD169 UL51 A95V and AD169 UL51 A95V-UL56 L257I in comparison to the parental strain AD169 WT. (C) Growth curves of the recombinant virus strain AD169 UL51 V113L and AD169 UL51 V113L-UL56 C325Y in comparison to the parental strain AD169 WT. (D) Growth curves of the recombinant virus strain AD169 UL51 17del in comparison to the parental strain AD169 WT. Fluorescent foci were counted daily from day 1 to day 7. Curves are the average of four independent experiments in triplicate. Mann-Whitney test was applied for statistical analysis: recombinant strains were compared to the parental strain. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$.

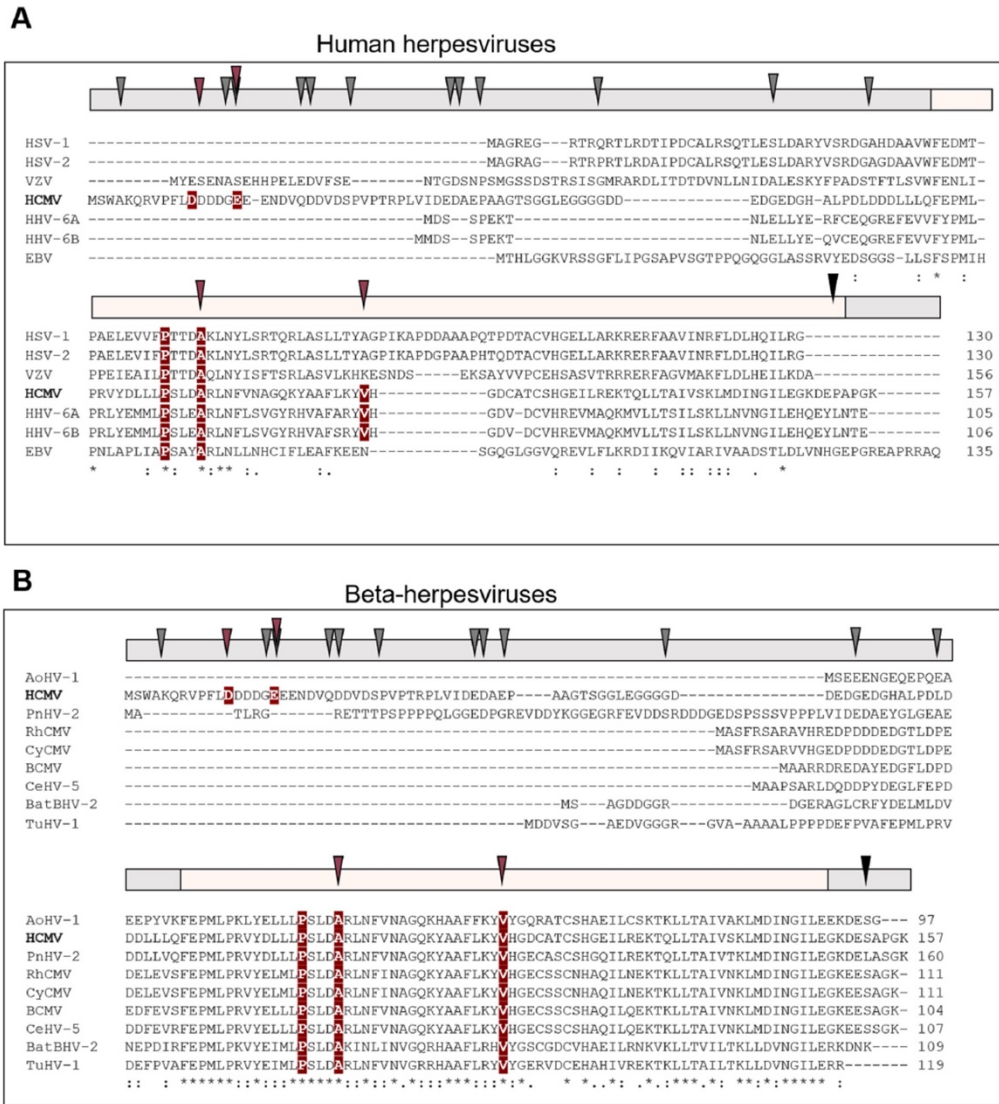


Fig. 4. Sequence alignment of the pUL51 homologs in human herpesviruses (A) and beta-herpesviruses (B). Mutations found to be novel in HCMV strains from treated patients compared to the pUL51 natural polymorphism are shown in white letters on a red background (D12E, 17del, A95V, V113L). The P91S mutation already described is also represented in white letters on a red background (Chou, 2017). The degree of amino acid conservation is represented as follows: “*” indicates a strictly conserved amino acid; “:” a site belonging to a group exhibiting strong similarity; “.” a site belonging to a group exhibiting a weak similarity.

suggested the presence of a possible ligand binding sites in the C-terminal part. These initial structural data were consistent with the “conclusions” drawn from polymorphism analysis and alignments. The three-dimensional structure of the HSV-1 packaging complex was elucidated in 2020 by cryo-electron microscopy (Yang et al., 2020). In order to validate the modelling of pUL51 determined by I-TASSER, structure alignment was performed after the pUL33 coordinates extraction from the PDB file (PDB: 6M5R). Superposition of the cryo-electron microscopy structure of HSV-1 pUL33 and HCMV pUL51 modelling structure showed strong similarities in the C-terminal part of both proteins (RMSD scoring in Fig. S1). As anticipated, differences observed were pronounced in the N-terminal part determined as a variable region with

polymorphism and protein alignment studies (Fig. 4).

Strains of studied patients possessed mutations in both proteins pUL56 and pUL51. The HCMV pUL51 protein structure was aligned with pUL33 in the whole HSV-1 terminase complex. Thus, pUL51 mutations can be reported in the model (Fig. 5). To identify the location of the pUL56 resistance mutations in HSV-1 terminase model, amino acid sequences of pUL56 and HSV-1 pUL28 were aligned together (Fig. S2). pUL56 mutated residues were reported in pUL28: for example, the corresponding amino acid of the mutation L257I in pUL56 corresponds to the residue D253 in pUL28. Fig. 5 presents HSV-1 terminase model where pUL33. In the HSV-1 terminase model, the location HCMV-UL51-A95 residue is very close from the HSV-1-UL28-D253 in the

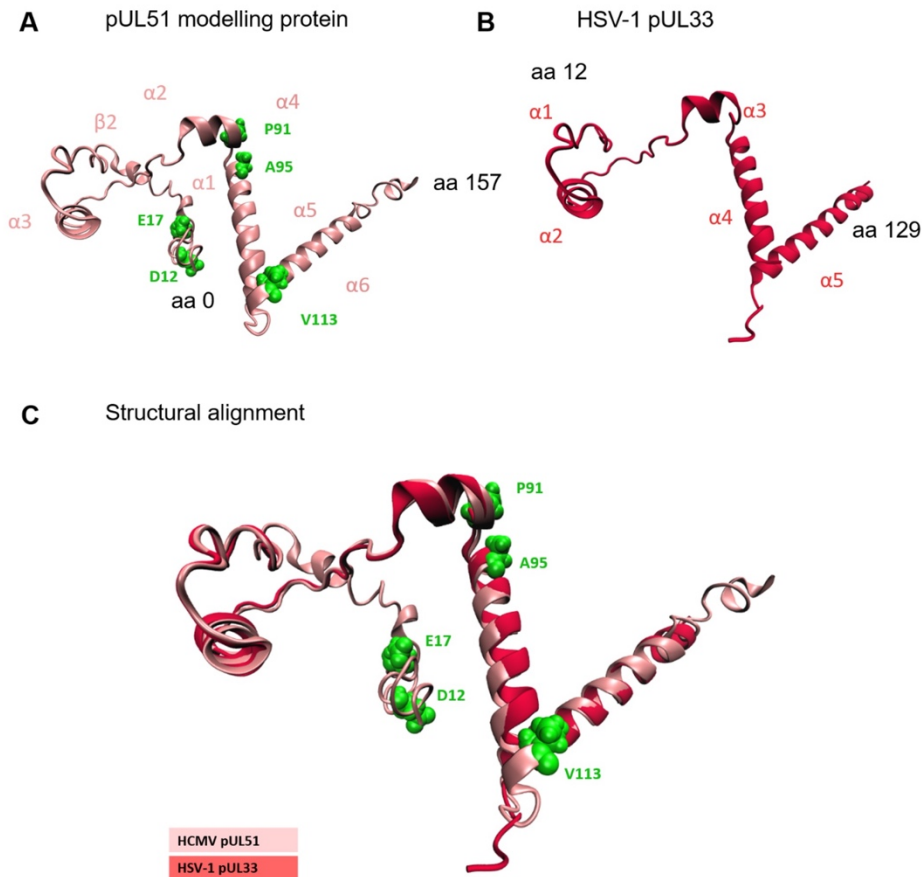


Fig. 5. Atomic structure of HCMV pUL51 and HSV-1 pUL33. (A) Modelling structure of the HCMV pUL51 protein using I-TASSER reports a protein composed of at least of 6 helices ($\alpha 1$ to $\alpha 6$) and a strand ($\beta 1$). (B) Cryo-electron microscopy structure of the HSV-1 pUL33, consisting of 5 helices ($\alpha 1$ to $\alpha 5$). (C) Structure superposition of the both proteins. Superposition of the proteins shows a higher atomic divergence for the N-terminal part. The atomic position of pUL33 residues was extracted from the PDB file 6M5R. Structures are represented with the drawing method “NewCartoon” using Visual Molecular Dynamics (VMD 1.9.3). HSV-1 pUL33 and HCMV pUL51 are respectively colored in red and pink. aa: amino acid, α : helix, β : strand.

tridimensional space, corresponding to HCMV-UL56-L257 (Fig. 6).

4. Discussion

pUL51 has been shown to be essential for viral replication and the normal packaging function of the terminase complex (Borst et al., 2013). LMV targets the terminase complex, however its mechanism of action remains to be elucidated. A resistance mutation (P91S) emerged by *in vitro* experiment in pUL51 under LMV pressure selection (Chou, 2017). Although not yet implemented in the clinical setting, we decided to sequence this gene in addition to *UL56* and *UL59* genes for non-responder patient receiving LMV. To identify putative resistance mutations in pUL51, we determined the *UL51* natural polymorphism by sequencing from 56 LMV-naïve patients. Working from clinical samples or isolates, we used NGS sequencing results, in order to detect minority variants. Sensitivity of the NGS method for minority mutants was previously determined between 2 and 5% in these conditions (personal unpublished data). Natural polymorphism is largely located in the N-terminal part of the protein from the amino acid 4 to the amino acid 70 with one mutation in the C-terminal part (S153P). Sequences alignments with pUL51 homologs from both human-herpesviruses and beta-herpesviruses revealed a variable part in N-terminal and a

conserved region in C-terminal from the amino acid Y86 to E158 suggesting the importance of this part for pUL51 structure-function. The difference between pUL51 homologs is due to the N-terminal part size. These results are consistent with previous works that argued that the pUL51 C-terminal part is crucial for terminase complex assembly (Borst et al., 2013; Neuber et al., 2017, 2018). The comparison of natural polymorphisms map with the 16 sequences from LMV-treated patients evidenced 4 new substitutions both detected by Sanger and NGS analysis (D12E, 17del, A95V, V113L).

The A95V substitution affects an alanine in position 95 completely conserved among herpesviruses suggesting the importance of this residue (Fig. 3). Alanine 95 is located at the beginning of the helix 5 (Fig. 5). The A95V change conserved the aliphatic characteristic of the amino acid and did not affect the viral growth (Fig. 3). However, this substitution may induce conformational changes because of the additional CH₃-group of valine. It could affect the interaction of LMV with specific amino acids, as the EC₅₀ increases by 13.8-fold (Table 2). Described by Chou in 2017, the substitution P91S confers a 3.8-fold increase in LMV EC₅₀ (Chou, 2017). The proline 91 is strictly conserved in herpesviruses as A95. P91 is located in a small region that could form a coil between the helices 4 and 5 (Fig. 5). These mutations, very close to each other, both confer resistance to LMV by their own. The

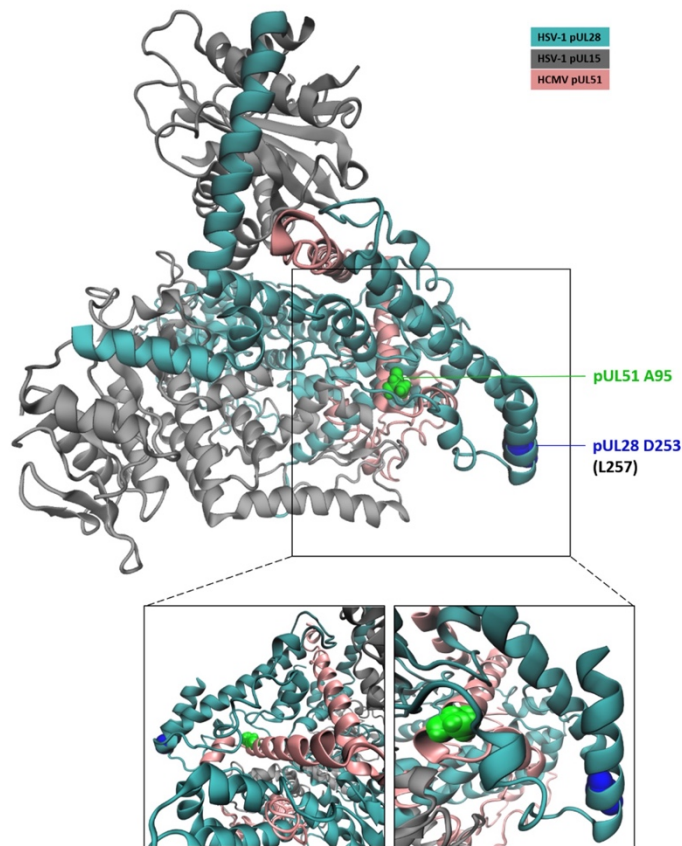


Fig. 6. Atomic structure of HSV-1 terminase complex. Cryo-electron microscopy structure of the HSV-1 terminase complex including HCMV-pUL51 protein structure instead of HSV-1-pUL33. Zoom of the part with both mutations found in pUL51 and the reported mutation in HSV-1-pUL28. Visualization of the structures was performed using Visual Molecular Dynamics (VMD 1.9.3). pUL15 (HSV-1), pUL28 (HSV-1) and pUL51 (HCMV) are represented in New-Cartoon and colored in grey, cyan and pink respectively. Residue implicated in a mutation are represented in VDW and colored in blue for pUL28 and in green for pUL51. pUL28 D253 corresponds to pUL56 L257.

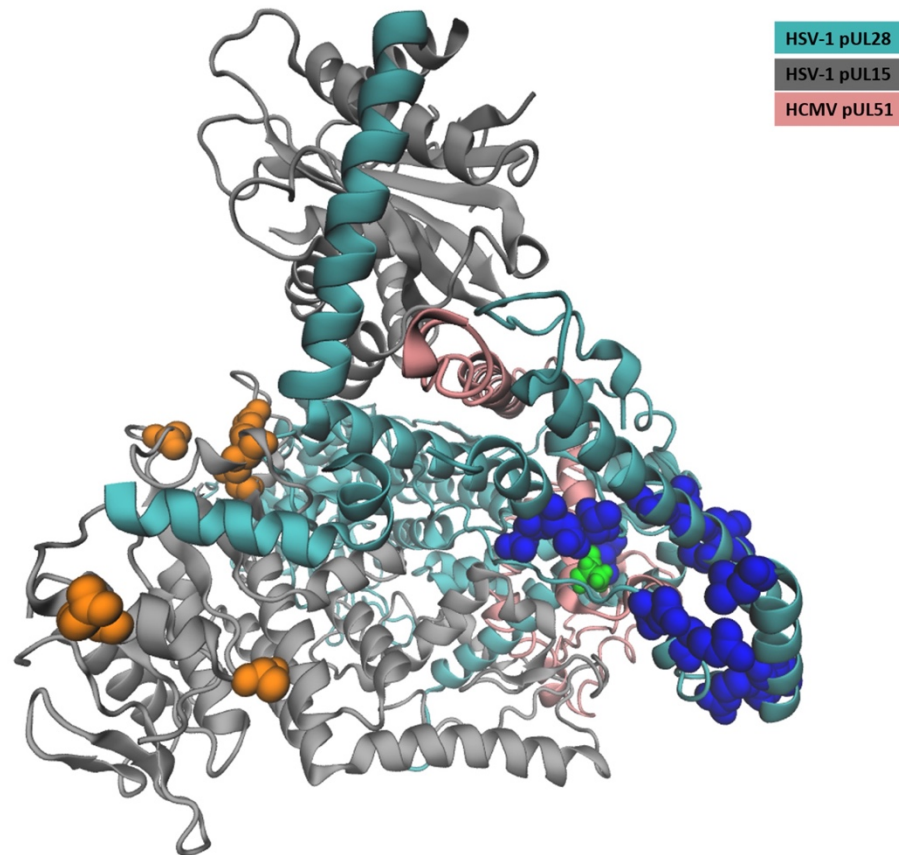
residue V113 is also located in the high conserved region; this amino acid is strictly conserved in beta-herpesviruses studied (Fig. 4). The substitution V to L does not change its aliphatic characteristic and did not affect the viral growth. Moreover, V113L substitution does not confer by itself a resistance to LMV. Finally, D12E and 17del substitutions are located in the high polymorphism part and are non-conserved among herpesviruses (Figs. 2 and 4). Both mutations do not influence the viral growth nor confer any resistance to LMV (Table 2, Fig. 3).

Double mutant viruses were built to study the effect of the *UL51* substitutions in combination with *UL56* substitutions. The *UL56*-L257I and *UL51*-A95V double mutants showed an EC50 of 271.39 ± 41.05 nM *UL56*-L257I was previously characterized and conferred 4- to 15-fold change in LMV EC50 (Chou, 2017). Thus, the combination of these both mutations largely increases the resistance to LMV (fold-change = 127.833) (Table 2). Both *UL56*-C325F and *UL56*-C325W mutations, already characterized, showed an EC50 ratio >3000 (Chou, 2015, 2020). The addition of the *UL51*-D12E and *UL51*-V113L to *UL56*-C325F and *UL56*-C325W, respectively, do not modify the level of resistance of pUL56 resistant mutations (Table 2). Indeed, for these both double mutants, the EC50 ratio is higher than 3000. Thus, these results

do not allow to know whether the combination of these mutations further increases LMV resistance. A substitution on the residue 17 was observed in a LMV-naïve strain (E17A). Due to the position in the high polymorphism part and the result associated to recombinant viruses, we can consider that *UL51*-D12E and *UL51*-17del are polymorphism substitutions.

Mutations conferring LMV resistance in the pUL89, pUL56, and pUL51 proteins were plotted in the model to gain insight into their localization (Fig. 7). The resistance mutations in pUL56 and pUL51 reported in the model are localized in a very small area of the complex. Due to the differences of sequences between HSV-1 and HCMV proteins, pUL56 residues S229, V231, N232, V236, E237 conferring a resistance to LMV cannot be reported in the model (Fig. 7). The pUL89 resistance mutations reported in HSV-1 pUL15 appear to be distant from the pUL56 mutations (Fig. 7, Fig. S3). However, as the complex assembles in hexamer and dodecamer, the region of pUL89 where the mutations localized could be close to the region harboring the mutations in pUL56 and pUL51 (Yang et al., 2020). Although functional domains of herpesviruses are conserved, LMV has no activity on HSV-1. This is probably due to differences of size and conformation of the proteins forming the terminase complex as demonstrated by alignment of pUL56 and pUL28 and

A



B

pUL56	C25	S229	V231	N232	V236	E237	L241	T244	L254	L257	K258	F261	Y321	C325	L328	M329	A365	N368	R369
pUL28	L31	/	/	/	/	/	N237	R240	S250	D253	R254	L265	R340	Q344	A347	A348	T386	D389	D390
pUL89	N320	N329	D344	T350	M359														
pUL15	Q367	A376	A391	Y400	L409														

Fig. 7. Atomic structure of HSV-1 terminase complex comprising reported letermovir mutation. (A) Cryo-electron microscopy structure of the HSV-1 terminase complex including HCMV-pUL51 protein structure instead of HSV-1-pUL33. pUL15, pUL28 and pUL51 are represented in NewCartoon and colored in grey, cyan and pink respectively. Residues implicating a letermovir resistance in pUL56, pUL89 are reported in pUL28 and pUL15 as described in the table. Residues implicating a letermovir resistance in pUL51 are directly reported in the structure. They are represented in “VDW” and colored in blue, orange and green, respectively. (B) Amino acid correspondence of resistance mutations described in pUL56 and pUL89 (Chou, 2020; Piret and Boivin, 2019).

localization of resistance mutations on this alignment (Figs. S2 and S3). Nevertheless, this model allows to better understand how the LMV could interact with pUL56, pUL51 and pUL89 and disrupt their interaction. All described resistance mutations could potentially block LMV fixation in a pocket formed by all 3 proteins of the complex. It could explain why the resistance mutations of pUL56 are not only localized in conserved regions contrary to what is classically described for other antiviral targets (Chou et al., 2003).

5. Conclusion

We herein confirm the role of pUL51 mutations in LMV resistance in the clinical setting and describe the first resistance mutation in a LMV-treated patient. As a single mutation in pUL51 can lead to LMV resistance with a 13.8-fold increase in EC₅₀, it is essential to systematically sequence the 3 genes encoding the complex terminase. Moreover, a combination of mutations in pUL56 or pUL51 can multiply the level of LMV resistance by 127.8-fold. By terminase modelling, we make the

hypothesis that LMV could bind to the domain where both P91S and A95V substitutions were localized. Moreover, we can make the hypothesis that the domains including both UL56-L257 and UL51-P91 and UL51-A95 could be involved in LMV interaction with the HCMV terminase complex as combined mutations can increase the level of resistance to LMV.

Author Contributions

Author Contributions: CM performed experiments, tridimensional and statistical analyses, wrote the manuscript, and prepared the figures. VT participated in research experiments and bioinformatics analysis for NGS. SA provided naïve samples and strains and coordinated the polymorphism study from clinical samples. EF, LF, IG, QL, AM provided the 16 resistant samples, to the NRC and reviewed the manuscript. SA and SH designed the research, coordinated the research and manuscript writing.

Declaration of competing interest

The authors declare that they have no known competing financial interests or personal relationships that could have appeared to influence the work reported in this paper.

Acknowledgments

The authors acknowledge Melissa Mayeras and Mathieu Lafarge from the technical facilities and clinicians from French hospitals for their assistance. We thank Gaëtan Muller for his expertise in bioinformatics.

Appendix A. Supplementary data

Supplementary data to this article can be found online at <https://doi.org/10.1016/j.antiviral.2022.105361>.

References

- Alain, S., Feghoul, L., Girault, S., Lepiller, Q., Frobert, E., Michonneau, D., Berceau, A., Ducastelle-Lepretre, S., Tilloy, V., Guerin, E., Le Goff, J., Peytavin, G., Hantz, S., 2020. Letemovir breakthroughs during the French Named Patient Programme: interest of monitoring blood concentration in clinical practice. *J. Antimicrob. Chemother.* 75, 2253–2257. <https://doi.org/10.1093/jac/dkaa135>.
- Andouard, D., Mazon, M.-C., Ligat, G., Couvreur, A., Pouteil-Noble, C., Cahen, R., Yasdanpanah, Y., Deering, M., Viget, N., Alain, S., Hantz, S., 2016. Contrasting effect of new HCMV pUL54 mutations on antiviral drug susceptibility: benefits and limits of 3D analysis. *Antivir. Res.* 129, 115–119. <https://doi.org/10.1016/j.antiviral.2016.02.004>.
- Borst, E.-M., Hahn, G., Koszinowski, U.H., Messerle, M., 1999. Cloning of the human cytomegalovirus (HCMV) genome as an infectious bacterial artificial chromosome in *Escherichia coli*: a new approach for construction of HCMV mutants. *J. Virol.* 73, 10.
- Borst, E.M., Kleine-Albers, J., Gabnev, I., Babić, M., Wagner, K., Binz, A., Degenhardt, I., Kalesse, M., Jonjić, S., Bauerfeind, R., Messerle, M., 2013. The human cytomegalovirus UL51 terminase is essential for viral genome cleavage-packaging and interacts with the terminase subunits pUL56 and pUL89. *J. Virol.* 87, 1720–1732. <https://doi.org/10.1128/JVI.01955-12>.
- Champier, G., Couvreur, A., Hantz, S., Rametti, A., Mazon, M.-C., Bouaziz, S., Denis, F., Alain, S., 2008. Original article Putative functional domains of human cytomegalovirus pUL56 involved in dimerization and benzimidazole D-ribonucleoside activity. *Antivir. Ther.* 12.
- Champier, G., Hantz, S., Couvreur, A., Stuppfler, S., Mazon, M.-C., Bouaziz, S., Denis, F., Alain, S., 2007. New functional domains of human cytomegalovirus pUL89 predicted by sequence analysis and three-dimensional modelling of the catalytic site DEXDc. *Antivir. Ther.* 16.
- Chee, M.S., Bankier, A.T., Beck, S., Bohni, R., Brown, C.M., Cerny, R., Horsnell, T., Hutchison, C.A., Kouzarides, T., Martignetti, J.A., 1990. Analysis of the protein-coding content of the sequence of human cytomegalovirus strain AD169. *Curr. Top. Microbiol. Immunol.* 154, 125–169. https://doi.org/10.1007/978-3-642-74980-3_6.
- Chou, S., 2020. Advances in the genotypic diagnosis of cytomegalovirus antiviral drug resistance. *Antivir. Res.* 176, 104711 <https://doi.org/10.1016/j.antiviral.2020.104711>.
- Chou, S., 2017. A third component of the human cytomegalovirus terminase complex is involved in letemovir resistance. *Antivir. Res.* 148, 1–4. <https://doi.org/10.1016/j.antiviral.2017.10.019>.
- Chou, S., 2015. Rapid *in vitro* evolution of human cytomegalovirus UL56 mutations that confer letemovir resistance. *Antimicrob. Agents Chemother.* 59, 6588–6593. <https://doi.org/10.1128/AAC.01623-15>.
- Chou, S., Lurain, N.S., Thompson, K.D., Miner, R.C., Drew, W.L., 2003. Viral DNA polymerase mutations associated with drug resistance in human cytomegalovirus. *J. Infect. Dis.* 188, 32–39. <https://doi.org/10.1086/375743>.
- 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. <https://doi.org/10.1128/JVI.05265-11>.
- Hirt, B., 1967. Selective extraction of polyoma DNA from infected mouse cell cultures. *J. Mol. Biol.* 26, 365–369. [https://doi.org/10.1016/0022-2836\(67\)90307-5](https://doi.org/10.1016/0022-2836(67)90307-5).
- Jacquet, C., Marschall, M., Andouard, D., El Hamel, C., Chianea, T., Tsogoeva, S.B., Hantz, S., Alain, S., 2020. A highly potent trimeric derivative of artesunate shows promising treatment profiles in experimental models for congenital HCMV infection *in vitro* and *ex vivo*. *Antivir. Res.* 175, 104700 <https://doi.org/10.1016/j.antiviral.2019.104700>.
- Li, W., Cowley, A., Uludag, M., Gur, T., McWilliam, H., Squizzato, S., Park, Y.M., Buso, N., Lopez, R., 2015. The EMBL-EBI bioinformatics web and programmatic tools framework. *Nucleic Acids Res.* 43, W580–W584. <https://doi.org/10.1093/nar/gkv279>.
- Ligat, G., Cazal, R., Hantz, S., Alain, S., 2018. The human cytomegalovirus terminase complex as an antiviral target: a close-up view. *FEMS (Fed. Eur. Microbiol. Soc.) Microbiol. Rev.* 42, 137–145. <https://doi.org/10.1093/femst/fuy004>.
- Linder, K.A., Kovacs, C., Mullane, K.M., Wolfe, C., Clark, N.M., La Hoz, R.M., Smith, J., Kotton, C.N., Limaye, A.P., Malinis, M., Halki, M., Mishkin, A., Gonzalez, A.A., Prono, M.D., Ostrander, D., Avery, R., Kaul, D.R., 2021. Letemovir treatment of cytomegalovirus infection or disease in solid organ and hematopoietic cell transplant recipients. *Transpl. Infect. Dis.* 23 <https://doi.org/10.1111/tid.13667>.
- 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. <https://doi.org/10.1128/AAC.01596-09>.
- McWilliam, H., Li, W., Uludag, M., Squizzato, S., Park, Y.M., Buso, N., Cowley, A.P., Lopez, R., 2013. Analysis tool web services from the EMBL-EBI. *Nucleic Acids Res.* 41, W597–W600. <https://doi.org/10.1093/nar/gkt376>.
- Muller, C., Alain, S., Gourin, C., Baumert, T.F., Ligat, G., Hantz, S., 2021. New insights into human cytomegalovirus pUL52 structure. *Viruses* 13, 1638. <https://doi.org/10.3390/v13081638>.
- Neuber, S., Wagner, K., Goldner, T., Lischka, P., Steinbrueck, L., Messerle, M., Borst, E.M., 2017. Mutual interplay between the human cytomegalovirus terminase subunits pUL51, pUL56, and pUL89 promotes terminase complex formation. *J. Virol.* 91 <https://doi.org/10.1128/JVI.02384-16>.
- Neuber, S., Wagner, K., Messerle, M., Borst, E.M., 2018. The C-terminal part of the human cytomegalovirus terminase subunit pUL51 is central for terminase complex assembly. *J. Gen. Virol.* 99, 119–134. <https://doi.org/10.1099/jgv.0.000984>.
- Piret, J., Boivin, G., 2019. Clinical development of letemovir and maribavir: overview of human cytomegalovirus drug resistance. *Antivir. Res.* 163, 91–105. <https://doi.org/10.1016/j.antiviral.2019.01.011>.
- Roy, A., Kucukural, A., Zhang, Y., 2010. I-TASSER: a unified platform for automated protein structure and function prediction. *Nat. Protoc.* 5, 725–738. <https://doi.org/10.1038/nprot.2010.5>.
- Schubert, L., Fisecker, L., Thalhammer, F., Burgmann, H., Steininger, C., 2021. Letemovir for the compassionate therapeutic use of cytomegalovirus infection. *Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.* 40, 435–439. <https://doi.org/10.1007/s10096-020-03990-w>.
- Sievers, F., Wilm, A., Dineen, D., Gibson, T.J., Karplus, K., Li, W., Lopez, R., McWilliam, H., Remmert, M., Söding, J., Thompson, J.D., Higgins, D.G., 2011. Fast, scalable generation of high-quality protein multiple sequence alignments using Clustal Omega. *Mol. Syst. Biol.* 7, 539. <https://doi.org/10.1038/msb.2011.75>.
- Yang, J., Yan, R., Roy, A., Xu, D., Poisson, J., Zhang, Y., 2015. The I-TASSER Suite: protein structure and function prediction. *Nat. Methods* 12, 7–8. <https://doi.org/10.1038/nmeth.3213>.
- Yang, J., Zhang, Y., 2015. I-TASSER server: new development for protein structure and function predictions. *Nucleic Acids Res.* 43, W174–W181. <https://doi.org/10.1093/nar/gkv342>.
- Yang, Y., Yang, P., Wang, N., Chen, Z., Su, D., Zhou, Z.H., Rao, Z., Wang, X., 2020. Architecture of the herpesvirus genome-packaging complex and implications for DNA translocation. *Protein & Cell* 11, 339–351. <https://doi.org/10.1007/s13238-020-00710-0>.

First clinical description of letermovir resistance mutation in cytomegalovirus *UL51* gene and impact on the terminase complex structure.

Clotilde Muller^{1,*}, Valentin Tilloy^{2,3}, Emilie Frobert⁴, Linda Feghoul⁵, Isabelle Garrigue⁶, Quentin Lepiller⁷, Audrey Mirand⁸, Egor Sidorov², Sébastien Hantz^{1,2,£}, Sophie Alain^{1,2*£}

¹ Univ. Limoges, INSERM, CHU Limoges, RESINFIT, U1092, F-87000 Limoges, France

² CHU Limoges, Laboratoire de Bactériologie-Virologie-Hygiène, National Reference Center for Herpesviruses (NRCHV), F-87000 Limoges, France

³ CHU Limoges, UF9481 Bioinformatique, F-87000 Limoges, France

⁴ CHU Lyon, UCL, Virology department, Lyon, France

⁵ CHU Saint Louis, AP-HP, Virology department, Paris France

⁶ CHU Pellegrin, Virology department, Bordeaux, France

⁷ CHU Besançon, Virology department, Besançon, France

⁸ CHU Clermont-Ferrand, Virology department, Clermont-Ferrand, France

£ S Hantz and S Alain: equal contribution as co-last author

*Corresponding authors:

clotilde.muller@unilim.fr (C.M.); sophie.alain@unilim.fr (S.A.)

SUPPLEMENTARY DATA

Table S1: Primers used for *UL51* amplification and sequencing.

Primers	Sequence 5' → 3'
UL51-Ext1	TGA TGG CGC ATA GGT TAC AG
UL51-Ext2	GCG GCC GAC ATG CGG GCG CG
UL51-Int1	CAT AGC AGT CAG TTG TCA AG
UL51-Int2	CTT GAG CAT GGC GTC GCA CA
UL51-2	TAC CCG ATC TTG ACG ACG AT
UL51-3	AGA GAG GGC AGC AAC AGA TC

The amplification protocol was as follows: denaturation for 3 min at 94°C; 45s at 94°C followed by 45s at 54°C and 1.3 min at 72°C for 40 cycles; and a final elongation step for 10 min at 72°C.

The PCR Mix is composed of :

- 5µL of DNA (from sample)
- 5µL of 10X PCR Extaq Buffer,
- 4µL of dNTP (2.5mM),
- 1.5µL per primer (10mM) (Ext1/Ext2 or Int1/Int2)
- 0.25µL of ExTaq polymerase (Takara, Kusatsu, Japon)
- qsp 50µL ultrapure PRC grade H2O.

Table S2: Primers used for HCMV-BAC recombinant viruses construction.

Mutation	Sens	5' → 3'
UL51 D12E	For	AAAAAGAATGTCCTGGGCTAAGCAGCGGGTGCCGTTTCTGGAGGATGACGACGGAGA GGAGGATAGGGATAACAGGGTAATCGATT
	Rev	CGTCATCCTGCACGTCGTTTTCTCCTCTCCGTCGTCATCCTCCAGAAACGGCACCCG CTGCTGCCAGTGTTACAACCAATTAACC
UL51 A95V	For	GCTGCCGCGCTCTACGATCTGTTGCTGCCCTCTCTGGACGTGCGCTAAATTTCTGTG AACGCTAGGGATAACAGGGTAATCGATT
	Rev	AGGCGGCGTACTTCTGACCCGCGTTACAGAAATTTAAGCGCACGTCCAGAGAGGGCA GCAACAGCCAGTGTTACAACCAATTAACC
UL51 V113L	For	CGTGAACGCGGGTCAGAAGTACGCCGCTTCTCAAGTACCTGCACGGCGACTGCGC GACCTGTAGGGATAACAGGGTAATCGATT
	Rev	GGAGGATCTCTCCGTGACTGCAGGTGCGCGAGTCGCCGTGGACGTAATTGAGGAAGG CGGCGTGCCAGTGTTACAACCAATTAACC
UL51 17del	For	CTGGGCTAAGCAGCGGGTGCCGTTTCTGGACGATGACGACGGAGAGGAAAACGACGT GCAGGATAGGGATAACAGGGTAATCGATT
	Rev	TCGGCACCGGAGAATCCACGTCATCCTGCACGTCGTTTTCTCCTCTCCGTCGTCATCGTC CAGAAGCCAGTGTTACAACCAATTAACC
UL56 C325F	For	GGGCATCACCATCCAGCAGCTAAATGTGTATCACCAGCTGTTTCGGGCGCTCATGAAC GGCATTAGGGATAACAGGGTAATCGATT
	Rev	CCCCGTACAGATGGCGACTGATGCCGTTTCATGAGCGCCCCGAAACAGCTGGTGATACA CATTTAGCCAGTGTTACAACCAATTAACC
UL56 C325Y	For	GGGCATCACCATCCAGCAGCTAAATGTGTATCACCAGCTGTACCGGGCGCTCATGAAC GGCATTAGGGATAACAGGGTAATCGATT
	Rev	CCCCGTACAGATGGCGACTGATGCCGTTTCATGAGCGCCCCGTACAGCTGGTGATACA CATTTAGCCAGTGTTACAACCAATTAACC
UL56 L257I	For	GACAACGCGCATCCCCACTTGGCTGGAGTCCTTTCGGCCATTAAGCCTATTCTCTT CTTCTAGGGATAACAGGGTAATCGATT
	Rev	TGTAGCTGTGGTAGGCCGATGAAGAAGAGAATAGGCTTTAATGGCCGAAAGGACTCC AGCCAGCCAGTGTTACAACCAATTAACC

Table S3: Sequences used for alignment of pUL51 homologs.

Identification	Virus	Protein	Residues	Accession number	
Human Herpesviruses	HSV-1	Herpes simplex type 1	pUL33	130	>QIB02221.1 UL33
	HSV-2	Herpes simplex type 2	pUL33	130	>ATD86769.1
	VZV	Varicella-zoster virus	UL33	156	>NP_040148.1
	HHV-6A	Human herpesvirus 6A	U35	105	>AVI09234.1
	HHV-6B	Human herpesvirus 6B	U35	106	>NP_050216.1
	EBV	Epstein Barr virus	UL33	135	>YP_401728.1
Beta-Herpesviruses	AoHV-1	Aotine betaherpesvirus 1	UL33	97	>YP_004940078.1
	HCMV	Human herpesvirus 5	pUL51	157	>P16792.1
	PnHV-2	Panine betaherpesvirus 2	UL51	160	>NP_612695.1
	RhCMV	Macacine betaherpesvirus 3	Rh82	111	>APT40324.1
	CyCMV	Cynomolgus cytomegalovirus	Cy82	111	>YP_009337501.1
	BCMV	Baboon cytomegalovirus	Ba82	104	>QQL09692.1
	CeHV-5	Cercopithecine betaherpesvirus 5	UL33	107	>YP_004936027.1
	BatBHV-2	Bat betaherpesvirus B7D8	B51	109	>AFK83881.1
	TuHV-1	Tupaiaid betaherpesvirus 1	T51	119	>NP_116405.1

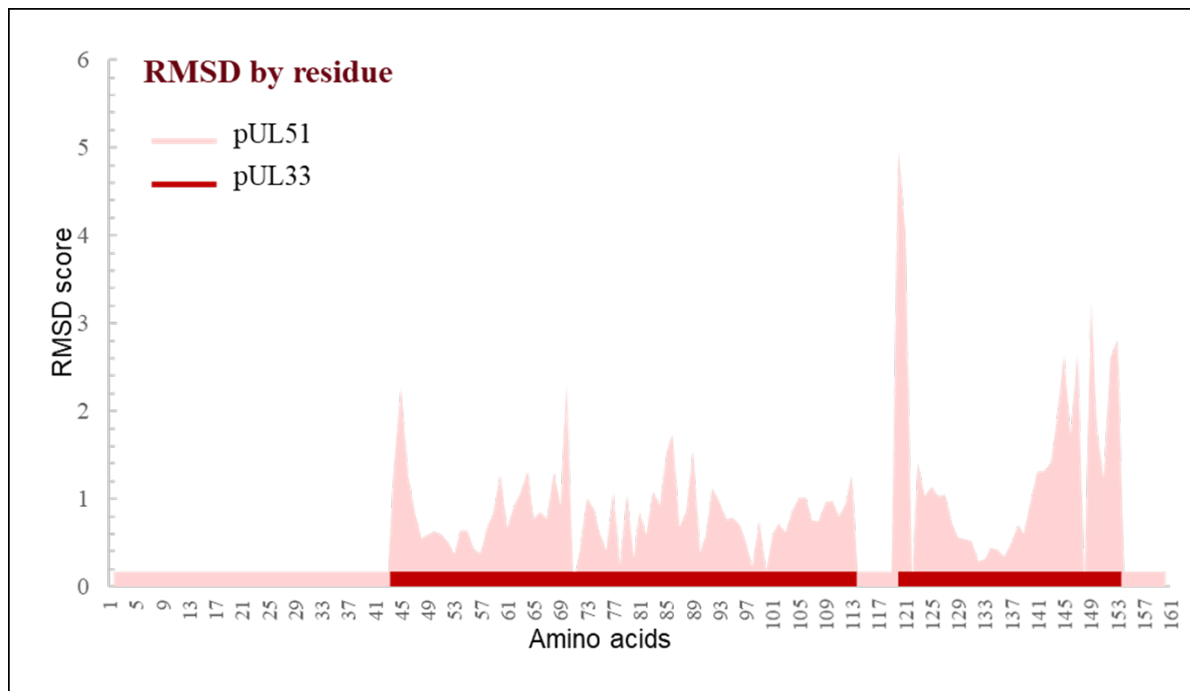


Figure S1: RMSD score of pUL33 and pUL51 structural alignment.

RMSD data (generated by VMD) were exported in Excel to illustrate the scoring across the proteins pUL33 and pUL51.

HSV-1 pUL28	MAAPVSEPTVARQKLLALLGQVQTYVFQIELLRRCDPHIGRGKLPQLKLNALQVRALRRR 60
HCMV pUL56	-----MEMNLLQKLCVVCCKNEYAMELE EL KYCDPNVLLAESTPFKRNAAAIVYLYRK 54 *** . : . : * : * : * : * : * : * : * : * : * : *
HSV-1 pUL28	LRPGLEAQAQAGFLTPLSVTLELLELLEYAWREGERLLGSLETFATAGDVAAFFTETMGLARP 120
HCMV pUL56	IYPEVVAQNRTQSSLLTLYLEMLLKALHEDTALLDRALMAYSRQPDRAAFYRTVLRDR- 113 : * : * * : : * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : *
HSV-1 pUL28	CPYHQVRVRLDTY-GGTVMHMLCFLHDVENFLKQLNYCHLITPSRGATAALERVREFMVGA 179
HCMV pUL56	CDRHHTVELQFTDNVRFVSLATLNDIERFLCKMNYVYGILAPEAGLEVCAQLELLRLR 173 * * * : * : * : . . : . * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : *
HSV-1 pUL28	VGSGLIVPELSDPSHPCAVCFEELCVTANQGATIARRLADRICNHVTQQAQVRL----- 234
HCMV pUL56	CGISPVARQEVYVEGTTCAQCYEELTIIIPNQGRSLNKRLQGLLCNHIAVHRPSSQ SDVNI 233 * . . : * : . * * * : * * * : * * * : * * * : * * * : * * * : *
HSV-1 pUL28	-----DANELRRLPHAAGLSDADRARALSVDHALARTAGGDGQPHSPENDSVRKEAD 289
HCMV pUL56	QT VEQDL DL T TRIPHLAGV LSAL K S ----- L S -----SSSSAYHSYIQEAE 275 * : * : * * * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : *
HSV-1 pUL28	ALLEAHDVFQATTPGLYAISELRFWLASGDRAGQTTMDAFASNLTAARRELQOETAAVA 349
HCMV pUL56	EALREYNLFTDIPRIYLSLDFTYWSRTSEVIVKRVG----ITIQQLNV YHQ CRAL MNG 331 * . : * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : *
HSV-1 pUL28	VELALFGRAEHFDRAFGSHLALDMVDALIIGGQATSPDDQIEALIRACYDHHLTTPLL 409
HCMV pUL56	ISRHLYGEDVE---DIFVLGEKALDGEERMFVGSV EAA PNRI IDLITSLSIQAFEDNPFV 388 : . * : * . * * * * * : : : * . : * : * : * : * : * : * : * : *
HSV-1 pUL28	RRLVSPEQCD-----EEALRRVLARMGAGGAADAPKGGAGPDDGDGRVAVEEGARG--- 460
HCMV pUL56	NKLHESNEMYTKIKHILEEIRRPL---PDGT-----GGDGPEGEAIHLRGREAMSGTGT 439 : * . : : * : * * * * * * * * * * * : : * . * *
HSV-1 pUL28	-----LGAPGGGGEDDED-----RRRPGGQGPETW-----GD---- 487
HCMV pUL56	TLMTASNSNSSTHSQRNNGGGGRARGGGKVVGGGVNGQDGDGSENGLRVRCDEHEAL 499 * * * . . . * . * * * * . : :
HSV-1 pUL28	-----IATQAAADVRRRRLYADRLTKRSLASLGRCVREQRGELEKMLRVSVHGEVLP 540
HCMV pUL56	DLVDARSRIHNVTREVNVRKRAYLQKVSEVGYGKVICIKTQERLTSKLIDVNLVGPLCL 559 : : : * . * * * * : : : . . : * : * : * . * : * : * : *
HSV-1 pUL28	ATFAAVANGFAARARFCALTAGAGTVIDNRSAPGVFDAHRFMRASLLRHQVDPALLPSIT 600
HCMV pUL56	DFISKLMNGFLYRSQYHQDQD-----VVDVGDQFTYDEHLYVVNNLIHKSLPVESLPLLG 614 : : : * * * * : : : : : . : * * * : : * : : : * * :
HSV-1 pUL28	HRFFELVNGPLFDHSTHSFAQPNTALYYSVENVGLLPHLKEELARFIMGAGGSGADWAV 660
HCMV pUL56	QQIYELCNGPLFTHCTDRYPLSHNVDMAYACDNAGVLPVKDDLKCAEGT-VYPSEWMV 673 : : : * * * * * * * * . * . : * . : * : * : * : * * * * * : * : * : * *
HSV-1 pUL28	SEFQRFYCFDGISGITPTQRAAWRYIRELIIATTLFASVYRCGELELRRPDCSRPTSEGR 720
HCMV pUL56	VKYMGGFFNFSDCQDLNVLQKEMMHWRELVLVSVALYNETFGKQLS----IACLR----DE 725 : : * : * * : * : * * * * : : * : * : * * . .
HSV-1 pUL28	YRYPPGVLYTYDSDCLVAIVESAPDGCIGPRSVVYDRDVFSLIYSVLQHLAPRLPDGG 780
HCMV pUL56	LHPDRDVLITYNKEWPLLRHEGS-----LYKSKDLYLLYRHLR-----PDES 770 : . * * * * : : * : * : * : * : * : * : * : * : * : *
HSV-1 pUL28	HDGPP----- 785
HCMV pUL56	GDVPTAPVAKPSTLTAAAASVGVFREPDRPWLSPYPSSTAGVSRVRATRKRPRRASS 830 * *
QIB02216.1	----- 785
HCMV pUL56	LLDLARDEHGIQDLVPGSLR 850

Figure S2: HSV-1 pUL28 and HCMV pUL56 sequence alignment.

HSV-1 pUL28 (QIB02216.1) and HCMV pUL26 (ABB71130.1) were aligned using ClustalW as described in material and method. The degree of amino acid conservation is represented as follows: “*” indicates a strictly conserved amino acid; “:” a site belonging to a group exhibiting strong similarity; “.” a site belonging to a group exhibiting a weak similarity. Amino acids involved in a LMV resistance are highlighted as white letters on black background.

HSV-1 PUL15	MFGQQLASDVQQYLERLEKQRQLKVGADAEASAGLTMGGDALRVPFLDFATATPKRHQTVV	60
HCMV-pUL89	MLRGDSAAKIQERYAELQKR-----KSHPTSCISTAFNTVATLCKRYQMMH	47
	*: : *.:*: .*:*: : . . . * :.* **:* :	
HSV-1 PUL15	PGVGTLHDCCEHSPLFSAVARRLLFNSLVPAQLKGRDFGGDHTAKLEF-LAPELVRVAR	119
HCMV-pUL89	PELGLAHSCEAFPLMAF-----CGRHRDYNPEESQRELLFHERLKSALDK	95
	* : * * * * : * . : * * . . . : * : : * * * :	
HSV-1 PUL15	LRFKCAPADVVPQRNAYSVLNTFQALHRSEAFRQLVHFVRDFAQLLKTFRASSLTET	179
HCMV-pUL89	LTFRPCSEE-----QRASYQLDALTELYRDFQFQINNFMDFPKWLDGGFSTAVEGD-	149
	* * : * : : . * * . * : : * * . * : : * * : * . * * : :	
HSV-1 PUL15	TGPPKKRAKVDVATHGRTYGTLELFQKMIIMHATYFLAAVLLGDHAEQVNTFLRLVFEIP	239
HCMV-pUL89	-----AKAIRLEPFQKNLLIHVIFFIATVKIPVLNRVLYLIHAFQID	193
	. * * * * : * . : * * . . : * * * : * * . * * :	
HSV-1 PUL15	LFSDAAVRHRFRATVFLVPRRHGKTWFLVPLIALSLASFRGIKIGYTAHIRKATEPVFE	299
HCMV-pUL89	FLSQTSIDIFKQKATVFLVPRRHGKTWFIPIIISFLKHMIGISIGYVAHQHVSQFVLK	253
	::*::: *:*:*****::*::: * : **.***.* :::: *::	
HSV-1 PUL15	EIDACLRGWFSGARVDHVKGETISFSFPDGRSTIVFASSHNTNGIRGQDFNLLFVDEAN	359
HCMV-pUL89	EVEFRCRHTFARDYVVENKDNVISID-HRGAKSTALFASCYNTNSIRGQNFHLLLVDEAH	312
	* : * * . * : * . * : . * : . * : * * : * * . * * : * * : * * :	
HSV-1 PUL15	FIRPDAVQTIMGFLNQANCKIIFVSSTNTGKASTSFLYNLRGADELNNVVTYICDDHMP	419
HCMV-pUL89	FIKKEAFNTILGFLAQNTTKIIFISSTNTTSSTCFRLRLNAPFDVLNVVSYVCEEHLH	372
	** : * : * * : * :	
HSV-1 PUL15	RVVTHTNATACSCYILNKPVFITMDGAVRRADLFLADSFMQEIIIGGQARETGDDRPVLT	479
HCMV-pUL89	SFTEKGDATACPCYRLHKPTFISLNSQVRKTANMFMPGAFMDEIIGGTNKISQNTV-LIT	431
	. . : : * :	
HSV-1 PUL15	KSAGERFLL--YRPSTTNSGLMAPDLYVYVDPAFNTANTRASGTGVAVVGRYRDDYIIFA	537
HCMV-pUL89	DQSREEFDILRYSTLNTNAYDYFGKTLVYLDPAFTNRKASGTGVAAVGAYRHQFLIYG	491
	. . : * * : * * * :	
HSV-1 PUL15	LEHFFLRALTGSAPADIARCVDHSLTQVLALHPGAFRGVRVAVEGNSSQDSAVAIAITHVH	597
HCMV-pUL89	LEHFFLRDLSESEVAIAECAAHMISVLSLHPY-LDELRIAVEGNTNQAAAVRIACLIR	550
	* * * * * * * * : * : . * * . * : . * * : * * * : : * * * * * * * * : * * * * * * :	
HSV-1 PUL15	TEMHRLASEGADAGSGPELLFYHCEPPGSVLYPFFLLNKQKTPAFEHFIKKFNSSGGVM	657
HCMV-pUL89	QSV-----QSSTLIRVLFYH-TPDQNHIEQPFYLMGRDKALAVEQFISRFNSGYIK	600
	. : : : : . : * * * * * * * * : * * * * * * * * : * * * * * * * * :	
HSV-1 PUL15	ASQBEIVSATVRLQTDPEYLLQLNLTETVSPNTDVRTYSGK-RNGASDDLMVAVIMAI	716
HCMV-pUL89	ASQELVSYTIKLSHDPIEYLLQIQNLHRVTLAEGTTARYSAKRQNRISDDLIIVAVIMAT	660
	* * * * * * * * * * : * : * * * * * * * * : * * . . . : . * :	
HSV-1 PUL15	YLAAQAGPPHTFAPITRVS 735	
HCMV-pUL89	YLCDDIHAIRFRV-----S 674	
	* * . : : . *	

Figure S3: HSV-1 pUL15 and HCMV pUL89 sequence alignment.

HSV-1 pUL15 (P04295.2) and HCMV pUL89 (P16732.1) were aligned using ClustalW as described in material and methods. The degree of amino acid conservation is represented as follows: “*” indicates a strictly conserved amino acid; “:” a site belonging to a group exhibiting strong similarity; “.” a site belonging to a group exhibiting a weak similarity. Amino acids involved in a LMV resistance are highlighted as white letters on red background.

PARTIE 2 : Identification de nouvelles cibles thérapeutiques en vue du développement de thérapies anti-CMVH

Comme discuté dans la revue « *Le complexe terminase, une cible de choix dans le traitement de l'infection à cytomégalovirus humain* » présentée en Annexe 3, l'intérêt grandissant pour l'étape d'encapsidation en fait une cible virale de choix. Les protéines impliquées dans cette étape d'encapsidation sont **indispensables** à la réplication virale et sont **spécifiques** aux herpèsvirus. Elles ne présentent donc pas d'homologues dans les cellules humaines.

Cette partie regroupe l'ensemble des travaux initiés sur l'identification de motifs structuraux essentiels à la structure-fonction des protéines pUL51 et pUL52. Un premier chapitre est dédié à l'étude de la partie C-terminale de la protéine pUL51. Le second est associé à l'analyse complète de la structure de pUL52.

A – Étude de la protéine pUL51, identification d'un motif Leucine Zipper

Nous avons montré par analyse du polymorphisme, alignement de séquences et modélisation que la protéine pUL51 était composée d'une région variable et d'une région conservée. Ces résultats sont concordants avec ceux préalablement publiés par Neuber *et al.* en 2018. La région conservée, située en C-terminale est essentielle pour la formation du complexe et est nécessaire à l'interaction avec pUL56 (Neuber *et al.*, 2018, 2017). Afin de comprendre de quel type d'interaction il s'agit, une étude plus approfondie de la séquence protéique a permis d'identifier des leucines répétées à espace régulier (**L126-X₆-L133-X₆-L140-X₆-L147**). Une leucine en position L132 est également présente. Ce type de motif est caractéristique d'un « **leucine zipper** » (LZ). Pour valider cette hypothèse, une approche par modélisation et mutagenèse dirigée a été réalisée. Les leucines ont été substituées par des alanines afin d'étudier leur l'impact sur la capacité du virus recombinant à répliquer.

Les leucines substituées une à une affectent la capacité du virus à croître de manière significative. Seule la substitution L132A n'entraîne pas d'impact sur la capacité répliquative. Par ailleurs, un effet cumulatif est observé ; la substitution simultanée de toutes ces leucines entraîne une abolition complète de la réplication virale.

Afin de confirmer ce potentiel motif comme étant une cible thérapeutique, une approche basée sur l'utilisation de peptides mimant le LZ est employée. Les essais menés montrent une inhibition significative de la réplication virale, cette approche souligne le potentiel d'exploitation de ce motif d'interaction pour développer de nouvelles molécules antivirales.

Ce travail fait l'objet d'un **article en cours de préparation pour la revue *Antiviral Research***.

Article 2

En préparation

Structure prediction and mutagenesis reveal essential Leucine Zipper motif in pUL51 for Human cytomegalovirus replication

Clotilde Muller¹, Sophie Alain^{1,2}, Sébastien Hantz^{1,2,*}

¹ Univ. Limoges, INSERM, CHU Limoges, RESINFIT, U1092, F-87000 Limoges, France

² CHU Limoges, Laboratoire de Bactériologie-Virologie-Hygiène, National Reference Center for Herpesviruses (NRCHV), F-87000 Limoges, France

*Corresponding author: Sébastien Hantz (sebastien.hantz@unilim.fr)

INTRODUCTION

The human cytomegalovirus (HCMV) is an opportunistic beta-herpesvirus pathogen for immunocompromised patients. It also represents the first viral cause of congenital infection. Conventional treatments are antiviral molecules targeting the viral polymerase pUL54 (ganciclovir, cidofovir and foscarnet). Despite their efficiency, their toxicity and the emergence of resistance lead to therapeutic challenges (Andouard et al., 2016; El Chaer et al., 2016; Leruez-Ville and Ville, 2017; Lurain and Chou, 2010). It is also necessary to develop new therapies targeting other stages of viral replication. The DNA-packaging step is highly specific of HCMV and has no equivalent in human cells; thus, this step represents a prime target for the development of new antivirals. This has been confirmed by the development of letermovir in the context of transplantation (Marty et al., 2017).

DNA-packaging process requires at least the action of the terminase complex composed of pUL56, pUL89 and pUL51. The pUL51 protein is the smallest of the terminase complex and is essential for the correct localization of the pUL56 and pUL89 proteins (Neuber et al., 2017).

The C-terminal part alone appears to be essential for maintaining the interaction between pUL56 and pUL89 discarding the utility of the N-terminal part for this function (Borst et al., 2013; Neuber et al., 2018). However, the growth deficiency generated by the recombinant virus encoding only the C-terminal part indicates that the N-terminal part also has a role in the viral

replication cycle (Neuber et al., 2018). *In silico* analyses and polymorphism study have been predicted an Intrinsically Disordered Regions (IDRs) part in the N-terminal region and a conserved region in C-terminal part (Neuber et al., 2018).

Improving knowledge of the functional domains and their interaction of pUL51 within the HCMV terminase complex is essential both for drug development and for improving existing drugs such as letermovir. The objective of the current study is to identify a minimal peptide of pUL51 with a putative key role in its interaction in the terminase complex. Previous studies encouraged us to focus on the putative involvement of the pUL51 C-terminal part (Muller et al., 2022; Neuber et al., 2018).

MATERIALS AND METHODS

Identification of conserved patterns and secondary structure prediction

The amino acid sequence of pUL51 from the HCMV reference strain AD169 was aligned with 9 homologous sequences from other herpesviruses, as described in Table S1. Alignments were performed as previously described using the Clustal Omega multiple sequence alignment (MSA) tools (McWilliam et al., 2013; Sievers et al., 2011). The degree of amino acid conservation is represented as follows: "*" strictly conserved; ":" high similarity; "." low similarity. The amino acid sequence of pUL51 HCMV (P16792.1) was submitted in I-TASSER (Roy et al., 2010; Yang et al., 2015; Yang and Zhang, 2015) as previously described (Muller et al., 2021b) and the final model with the highest confidence score (c-score) was analyzed using VMD 1.9.4 (Visual Molecular Dynamics).

Cells and bacterial strains

Human fibroblasts MRC-5 (bioMérieux, Marcy l'Etoile, France) as previously described (Muller et al., 2021b). *Escherichia coli* strain GS1783 was used for BAC mutagenesis (Borst et al., 1999). The HCMV-BAC contains an enhanced green fluorescent protein (EGFP) gene in the unique short region and was derived from parental strain pHB5, the BAC-cloned genome of the HCMV laboratory strain AD169 (Chee et al., 1990, p. 199) (Gift from M. Messerle, Univ. Hannover, Germany).

Bacterial Artificial Chromosome Mutagenesis

UL51 mutations were introduced by "*en passant*" mutagenesis into the EGFP-expressing HCMV BAC containing an enhanced green fluorescent protein (EGFP) gene in the unique short region derived from laboratory strain AD169 as previously described (Muller et al.,

2021b). Mutant construction and primers for mutagenesis are described in Supplementary Table S2 and S3. The presence of the mutations in *UL51* gene was confirmed for each mutant virus by Sanger sequencing prior transfection and for each recombinant virus growing in cell-culture after viral DNA extraction from infected cells using the Hirt protocol (Hirt, 1967). We have previously shown that “en passant” mutagenesis does not introduce other mutations that could have a negative impact on viral replication (Ligat et al., 2017).

Growth Curve Analysis

To estimate the impact of each mutation on viral fitness the recombinant strain and AD169-WT were inoculated in 48-well MRC-5 culture at a (MOI) of 0.01. From day 1 to day 8 post-inoculation, number of fluorescent cytopathic foci was counted to establish viral growth curves for each recombinant.

Viral Immediate Early and late proteins expression

A transfection of mutated HCMV-BAC into human fibroblasts MRC-5 using the liposomal reagent Transfast™ (Promega, France) was performed. Cells were fixed at 5 days post transfection, and immunostaining was performed for viral immediate early (anti-IE1 antibody; Argene, France) and late (anti-gB antibody; Abcam, UK) proteins in transfected cells.

RESULTS

Identification of a LZ pattern into pUL51 C-terminal part

The pUL51 protein is a leucine-rich protein (12.7%) with a polymorphism located in the N-terminal part. Sequence analysis of the pUL51 protein reveals a succession of leucines spaced 6 residues apart in the C-terminal part (L126-X6-L133-X6-L140-X6-L147) with a high potential to form a leucine zipper (LZ domain) (Figure 1, A). The heptad leucines within this region are conserved in all the beta-herpesviruses pUL51 homologs shown in Figure 1, B. There is also a leucine at the position L132. The helical wheel representation of the pUL51-LZ domain has invariant leucines line up on one side of the helix (Figure 1, C). To investigate the putative LZ structure, the pUL51 protein model was used. C-terminal part is structured as helices and L126, L133 and L140 are aligned. However, the orientation of L132 and L147 is different. For L147 it is probably due to the unwell structured helix by the modelling structure (Figure 1, D).

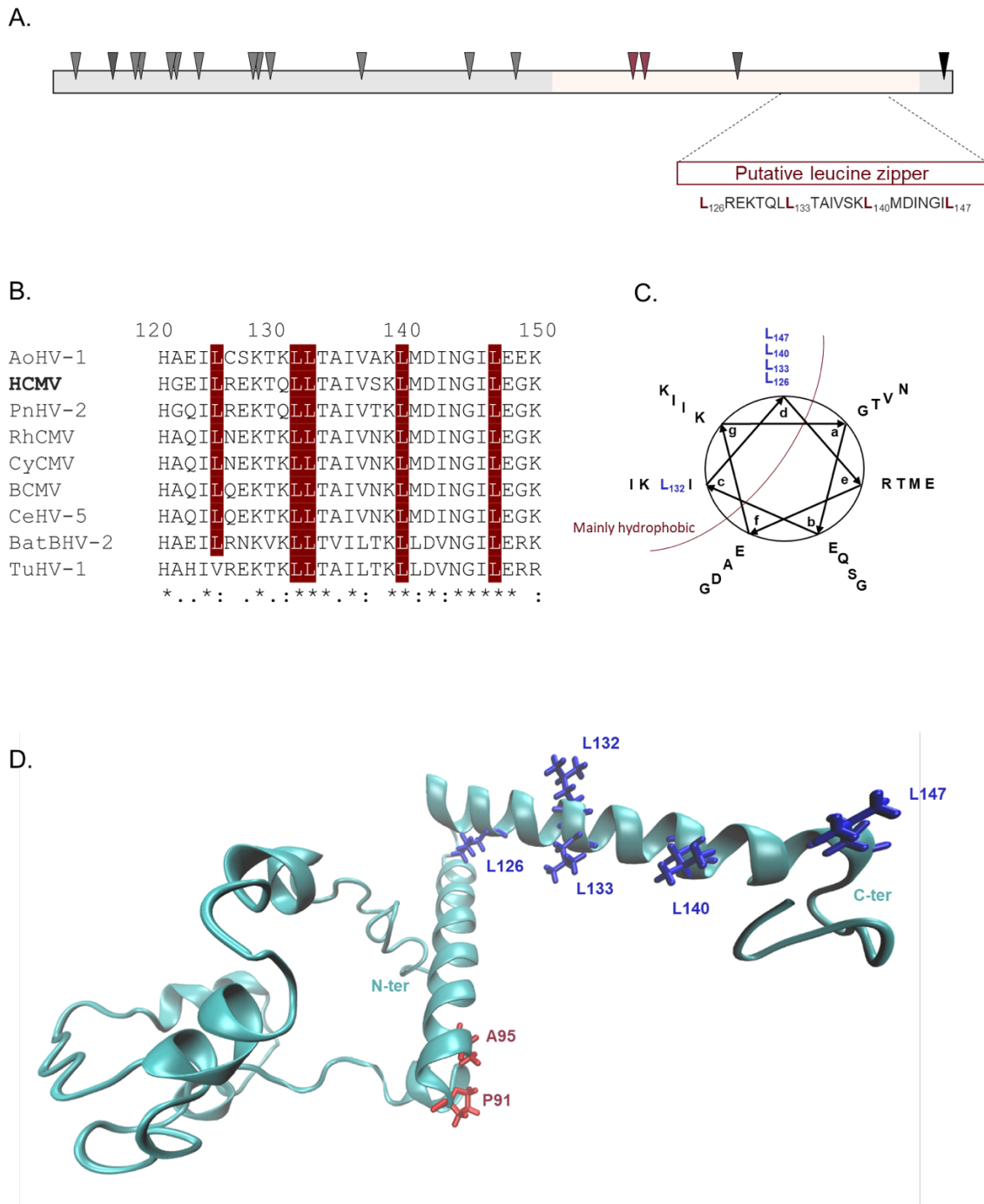


Figure 1: A putative leucine zipper domain is present within the pUL51 protein. (A) Structure and polymorphism distribution of pUL51 protein, the grey and peach puff parts respectively represent variable and conserved regions. Black and Grey triangles represent polymorphism substitution from reference strains (black triangle) or naïve strains (grey triangle). Red triangles correspond to resistance mutation to LMV. **(B)** Sequence alignment of the pUL51 homologs in beta-herpesviruses. Leucines are shown in white letters on a red background. The degree of amino acid conservation is represented as follows: “*” indicates a strictly conserved amino acid; “:” a site belonging to a group exhibiting strong similarity; “.” a site belonging to a group exhibiting a weak similarity. **(C)** Helical wheel representation of the LZ motif. **(D)** Modelling structure of the HCMV pUL51 protein. Structure is represented with the drawing method “NewCartoon” using Visual Molecular Dynamics (VMD 1.9.3). Leucines and resistance mutations are respectively represented in blue and red. Sequence numbering is consistent with that of AD169 residues.

Mutations within the putative leucine zipper abrogate viral replication

In order to test the significance of the predicted leucine zipper in pUL51, leucines of the potential LZ were substituted one by one by building recombinant viruses in order to measure their impact on the ability of virus to replicate. One recombinant virus was built with 5 substitutions (L126A, L132A, L133A, L140A and L147A). 11 days after transfection; small foci were observed for L126A, L133A, L140A and L147A substitutions, foci similar to the WT for L132A substitution and only transfected cells were observed for the mutants harboring all the substitutions (Table 1 and Figure S2).

The assessment of the impact on viral fitness of L126A, L132A, L133A, L140A and L147A substitutions was compared with the parental strain AD169-WT. All *UL51* single substitutions tested can replicate in human fibroblasts. However, L126A, L133A, L140A, L147A substitutions significantly reduced the virus ability to produce infectious particles, showing that they have an impact on HCMV replication fitness (Figure 2). As anticipated, L132A do not have any impact on the virus ability to growth.

Table 1: Overview of recombinant viruses in putative pUL51-LZ motif with their respective amino acid exchanges and the mutation effect on viral replication (foci).

Amino acids	Mutations	Mutant HCMV-BAC	Day 5 post transfection	Day 11 post transfection
<i>UL51</i> WT	/	/	-	++
<u>L</u> REKTQLLTAIVSKLMDINGIL	A REKTQLLTAIVSKLMDINGIL	UL51 L126A	-	+
LREKTQ <u>L</u> LTAIVSKLMDINGIL	LREKTQ A LTAIVSKLMDINGIL	UL51 L132A	-	++
LREKTQ <u>L</u> LTAIVSKLMDINGIL	LREKTQ L AIVSKLMDINGIL	UL51 L133A	-	+
LREKTQLLTAIVSK <u>L</u> MDINGIL	LREKTQLLTAIVSK A MDINGIL	UL51 L140A	-	+
LREKTQLLTAIVSKLMDINGI <u>L</u>	LREKTQLLTAIVSKLMDINGI A	UL51 L147A	-	+
<u>L</u> REKTQ <u>L</u> LTAIVSKLMDINGIL	A REKTQ A AIVSK A MDINGI A	UL51 L*5A	-	-

Amino acid changed are underlined and in bold. / : no change ; - : absence of viral growth ; + : small foci ; ++ : foci ; HCMV-BAC : Bacterial Artificial Chromosome containing the genome of the CMVH laboratory strain AD169

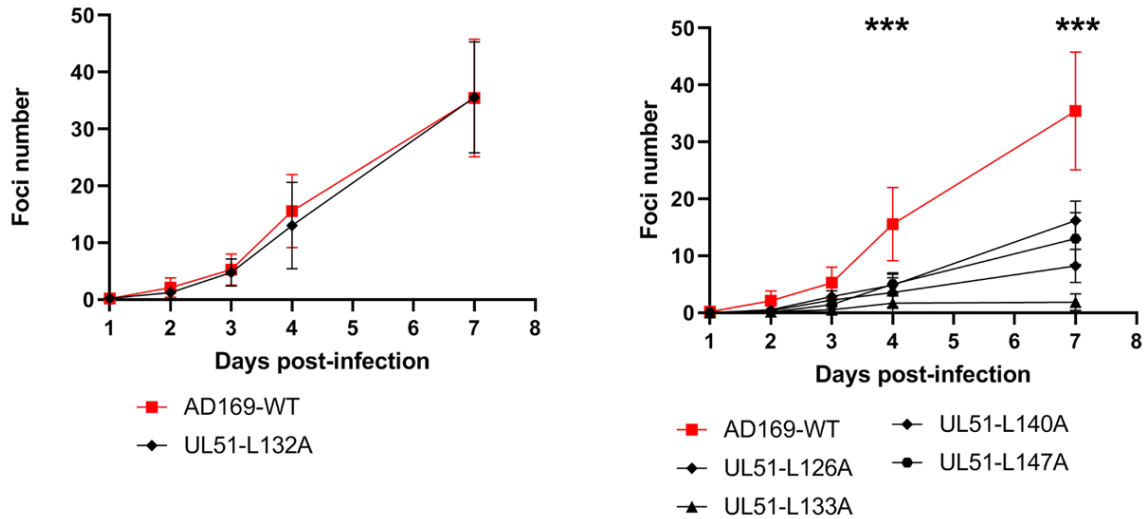


Figure 2: Growth curves analysis of the pUL51 recombinant viruses. Growth curves of the recombinant virus strain UL51-L126A, UL51-L132A, UL51-L133A, UL51-L140A, UL51-L147A in comparison to the parental strain AD169-WT. Fluorescent foci were counted daily from day 1 to day 7. Curves are the average of three independent experiments in triplicate. Mann-Whitney test was applied for statistical analysis and recombinant strains were compared to the parental strain. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$.

pUL51 mutations do not impact the viral gene expression

To test whether these substitutions may disrupt another step in HCMV replication, immunostaining assays were performed to detect proteins produced at immediate early and late stages of viral cycle (IE and late proteins). Expression of immediate early (IE) and late (gB) viral genes were both detected, indicating that substitutions have no impact on viral gene expression (Figure 3).

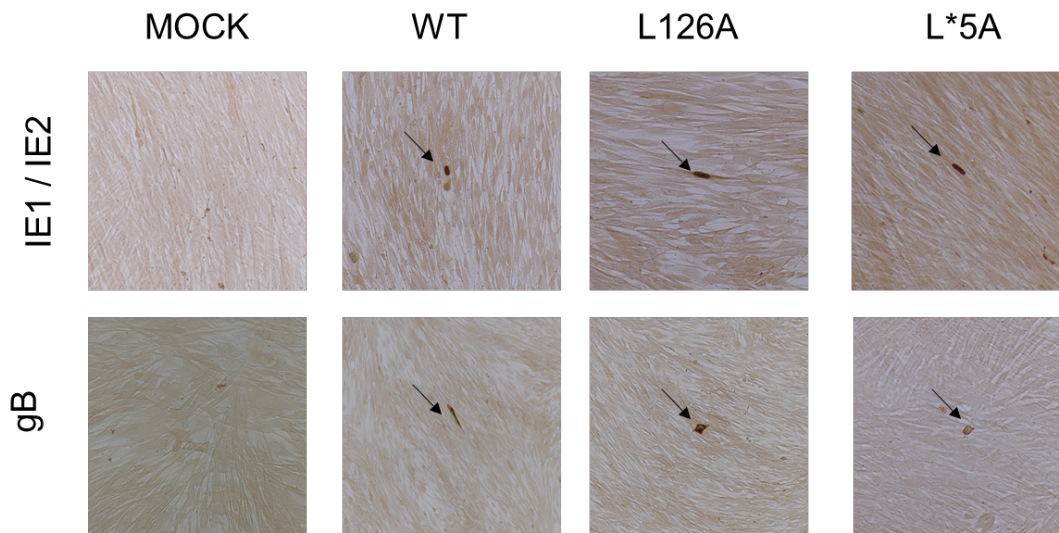


Figure 3: pUL51 substitutions do not affect viral late expression. MRC-5 were transfected with the parental strain (WT) or with recombinant viruses (AD169-L126A and AD169-L*5A). At day 5 post-transfection, immunostaining was performed for early (IE1/IE2) and late (gB) viral proteins. Black arrow corresponds to infected cells. Magnification: 100X.

DISCUSSION

Current therapies against HCMV infections are based on nucleoside analogues that target viral genome replication, a process achieved by DNA polymerase UL54. These therapies therefore suffer from cytotoxicity and drug resistance, which generates a need for potent non-nucleosidic antiviral compounds. Compounds that target HCMV terminase formation or stability are a potential option, as HCMV terminase complex has no counterpart in cells.

The pUL51 protein has an essential role in the function of the complex terminase for the packaging of genomic units (Borst et al., 2013). Analysis of the pUL51 polymorphism in more than 72 strains of letermovir-naive patients showed that the polymorphism was located on the non-conserved N-terminal part (Muller et al., 2022). The C-terminal part, highly conserved in beta-herpesviruses, is essential for the functioning of the complex since its deletion leads to an absence of viral replication (Borst et al., 2013). Moreover, 2 resistance mutations have been described in this protein demonstrating its involvement in the mechanism of action of letermovir (Chou, 2017; Muller et al., 2022).

The analysis of the primary sequence of pUL51 revealed 4 heptad leucines separated by 6 residues. This motif is typical of a leucine zipper (Hirst et al., 1996). The substitution of these residues by the recombinant viruses building method allowed us to highlight a cumulative effect. Each mutation separately affects viral replication significantly. Only the accumulation of substituted leucines does not allow observing any viral growth. This suggests the importance of these residues for the structure/function of the protein and for viral replication. Helical wheel representation, pUL51 modeling and mutagenesis suggest a non-involvement of L132 in the LZ motif. Our protein modelling and mutagenesis reveal a Leucine zipper motif that seems to offer a promising target for developing antiviral agents.

CONCLUSION

In conclusion, these results provide new data about pUL51 structure function. The pUL51-Lz is a starting point or even a possible lead compound for the development of drugs targeting HCMV.

SUPPLEMENTARY DATA

Table S1: Sequences used for alignment of pUL51 homologs.

Identification	Virus	Protein	Residues	Accession number	
Beta-Herpesviruses	AoHV-1	Aotine betaherpesvirus 1	UL33	97	>YP_004940078.1
	HCMV	Human herpesvirus 5	pUL51	157	>P16792.1
	PnHV-2	Panine betaherpesvirus 2	UL51	160	>NP_612695.1
	RhCMV	Macacine betaherpesvirus 3	Rh82	111	>APT40324.1
	CyCMV	Cynomolgus cytomegalovirus	Cy82	111	>YP_009337501.1
	BCMV	Baboon cytomegalovirus	Ba82	104	>QQL09692.1
	CeHV-5	Cercopithecine betaherpesvirus 5	UL33	107	>YP_004936027.1
	BatBHV-2	Bat betaherpesvirus B7D8	B51	109	>AFK83881.1
	TuHV-1	Tupaiaid betaherpesvirus 1	T51	119	>NP_116405.1

Table S2: Primers used for *UL51* amplification and sequencing.

Primers	Sequence 5' → 3'
UL51-Ext1	TGA TGG CGC ATA GGT TAC AG
UL51-Ext2	GCG GCC GAC ATG CGG GCG CG
UL51-Int1	CAT AGC AGT CAG TTG TCA AG
UL51-Int2	CTT GAG CAT GGC GTC GCA CA
UL51-2	TAC CCG ATC TTG ACG ACG AT
UL51-3	AGA GAG GGC AGC AAC AGA TC

Table S3: Primers used for UL51-HCMV-BAC recombinant viruses construction.

Mutation	Sens	5' → 3'
UL51 L126A	For	CGTGCACGGCGACTGCGCGACCTGCAGTCACGGAGAGATCGCTCGTGAGAA GACGCAACTATTTAGGGATAACAGGGTAATCGATT
	Rev	GCTTGCTGACGATCGCCGTTAATAGTTGCGTCTTCTCACGAGCGATCTCTCC GTGACTGCAGGGCCAGTGTTACAACCAATTAACC
UL51 L132A	For	GACCTGCAGTCACGGAGAGATCCTCCGTGAGAAGACGCAAGCTTTAACGGC GATCGTCAGCAATAGGGATAACAGGGTAATCGATT
	Rev	TTCCGTTAATGTCCATGAGCTTGCTGACGATCGCCGTTAAAGCTTGCGTCTTC TCACGGAGGAGCCAGTGTTACAACCAATTAACC
UL51 L133A	For	CAGTCACGGAGAGATCCTCCGTGAGAAGACGCAACTAGCTACGGCGATCGTC AGCAAGCTTAGGGATAACAGGGTAATCGATT
	Rev	GGATTCCGTTAATGTCCATGAGCTTGCTGACGATCGCCGTAGCATAGTTGCG TCTTCTCACGGGCCAGTGTTACAACCAATTAACC
UL51 L140A	For	CCGTGAGAAGACGCAACTATTAACGGCGATCGTCAGCAAGGCTATGGACATT AACGGAATCCTTAGGGATAACAGGGTAATCGATT
	Rev	CGCCGATTTATTTACCCGGCGCCGACTCGTCTTTTCCCTCAGCGATTCCGTTA ATGTCCATGAGCCAGTGTTACAACCAATTAACC
UL51 L147A	For	AACGGCGATCGTCAGCAAGCTCATGGACATTAACGGAATCGCGGAGGGAAAA GACGAGTCGGCTAGGGATAACAGGGTAATCGATT
	Rev	CCCCGTACAGATGGCGACTGATGCCGTTTCATGAGCGCCCGAAACAGCTGGT GATACACATTTAGCCAGTGTTACAACCAATTAACC
UL51 L140A L147A	For	GACGCAACTATTAACGGCGATCGTCAGCAAGGCTATGGACATTAACGGAATC GCTGAGGGTAGGGATAACAGGGTAATCGATT
	Rev	CCGGCGCCGACTCGTCTTTTCCCTCAGCGATTCCGTTAATGTCCATAGCCTTG CTGACGAGCCAGTGTTACAACCAATTAACC
UL51 L126A L132A L133A	For	CGGCGACTGCGCGACCTGCAGTCACGGAGAGATCGCTCGTGAGAAGACGCA AGCTGCTACGGCTAGGGATAACAGGGTAATCGATT
	Rev	CTTGCTGACGATCGCCGTAGCAGCTTGCGTCTTCTCACGAGCGATCTCTCCG TGACTGCAGGTGCCAGTGTTACAACCAATTAACC

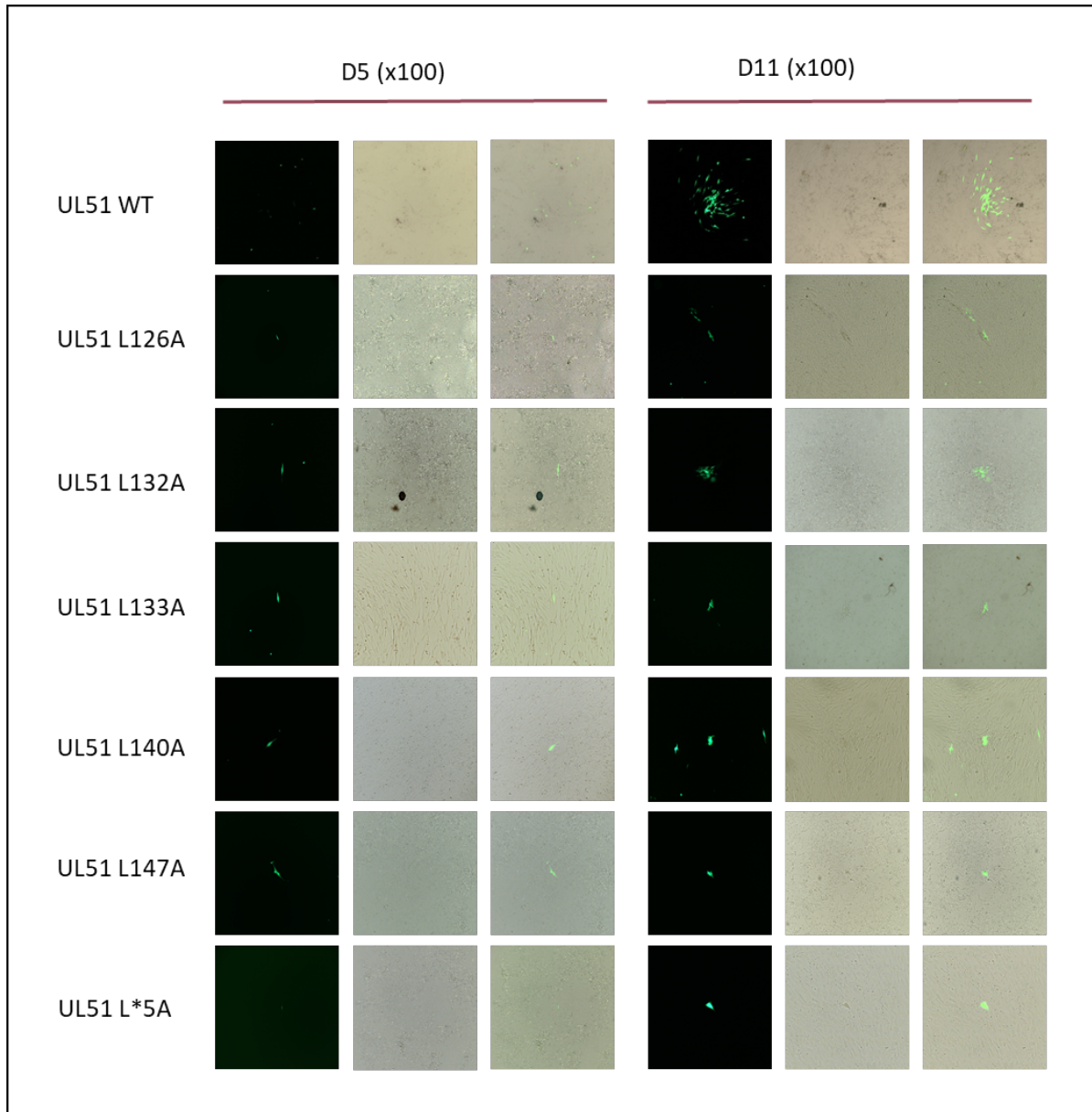


Figure S2: Plaque formation assay in MRC-5 cells after transfection of HCMV-BAC-UL51 WT (AD169) or recombinant virus strains for UL51 putative LZ. Green fluorescent foci were observed with the wild-type HCMV-BAC-UL51 and single infected cells were observed with the other recombinant viruses. Eleven days after transfection of human fibroblasts, we observed small cytopathic effect. Replication capacity was determined for each mutation to see how they impaired viral replication and propagation in cell-culture. "L*5A" corresponds to the mutant with the 5 substitutions.

Travaux complémentaires : Validation de la cible thérapeutique par le développement d'un peptide inhibiteur

Les résultats de cette étude révèlent une cible thérapeutique prometteuse pour le développement d'agents antiviraux.

Nous pensons qu'un **court peptide mimant le motif LZ pourrait entrer en compétition au niveau du site d'interaction du LZ de pUL51**. L'interaction de pUL51 avec ses partenaires du complexe terminase serait alors perturbée ; une inhibition de la réplication du CMVH pourrait être observée. Afin de tester cette hypothèse, nous avons développé un peptide et effectué des essais antiviraux et des tests de cytotoxicité (**Figure 23**).

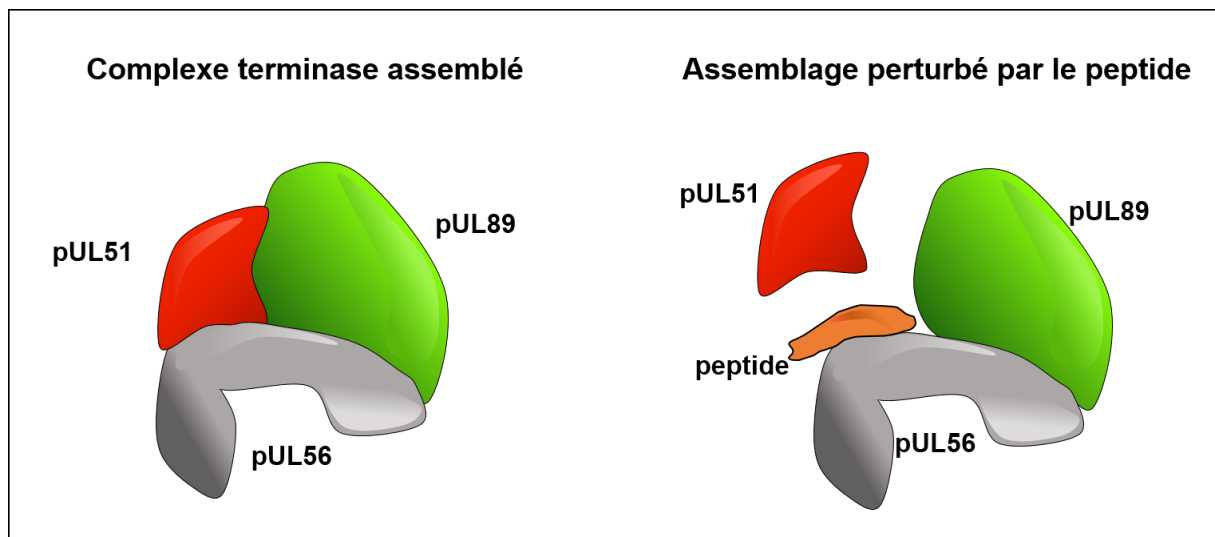


Figure 23 : Mode d'action théorique d'un peptide homologue à un domaine essentiel pour la réplication virale.

MATÉRIELS ET MÉTHODES :

Conception du composé antiviral imitant le motif pUL51-LZ

Un peptide mimant le pUL51-LZ a été synthétisé par Proteogenix (Strasbourg, France). Le peptide a une pureté supérieure à 95 %, vérifiée par analyses HPLC et spectrométrie de masse (rapport du fournisseur). La séquence peptidique est la suivante ;

AC-GRKKRRQRRPPQHGEILREKTQLLTAIVSKLMDINGILEGK-NH₂

Elle se compose **(I)** d'une séquence TAT (soulignée) et **(II)** et de la séquence du motif pUL51-LZ (nommé HK29). La séquence TAT correspond à un peptide de pénétration cellulaire (CPP) issu de la protéine TAT du VIH et permet à elle seule de pénétrer dans une cellule (Habault and Poyet, 2019; Reissmann, 2014). Coupler ce peptide TAT à la séquence HK29 favoriserait ainsi l'entrée cellulaire du peptide complet que nous nommerons **TAT-HK29**. Le peptide a été reconstitué dans de l'eau MilliQ à 1 mM et conservé à -20 °C. Pour les essais antiviraux, le peptide a été dilué dans le milieu cellulaire (supplémenté en sérum de veau fœtal et antibiotiques) pour obtenir une concentration finale de 10 µM avant de réaliser des ½ dilutions en série jusqu'à 0,156 µM.

Modélisation structurale du peptide imitant le motif pUL51-LZ

La séquence d'acides aminés du peptide a été soumise dans I-TASSER comme décrit précédemment (Muller et al., 2021b; Roy et al., 2010; Yang et al., 2015; Yang and Zhang, 2015). Le modèle final avec le score de confiance le plus élevé (c-score) a été analysé en utilisant VMD 1.9.4 (Visual Molecular Dynamics).

Test de cytotoxicité

La libération de la lactate déshydrogénase (LDH) a été mesurée à l'aide du kit CytoTox 96® Non-Radioactive Cytotoxicity Assay (Promega, France) selon les instructions du fabricant. La libération de LDH est déterminée par la conversion d'un sel de tétrazolium en un produit formazan. Des cellules MRC-5 confluentes ont été incubées pendant 5 jours dans un milieu de culture contenant les dilutions de peptide allant de 0,156 à 10 µM. Les milieux de culture cellulaire ont ensuite été recueillis et le niveau de LDH a été déterminé en mesurant l'absorbance à 490 nm avec un lecteur de plaque multimode EnSpire® (Perkin Elmer, USA). La cytotoxicité associée aux antiviraux a été calculée en soustrayant la mort cellulaire spontanée pour chaque condition testée et les résultats ont été exprimés en proportion de la mort cellulaire à 100 %.

Validation de la cible thérapeutique par le peptide mimant le motif LZ de pUL51

L'évaluation de l'efficacité du peptide a été réalisée par des essais antiviraux. Les résultats sont résumés dans la **figure 25, B**. Cinq jours après le traitement des cellules infectées par la souche de référence AD169, nous avons observé une réduction d'environ 25 % du nombre de foyers infectieux par rapport au contrôle sans traitement à partir d'une concentration de 0,156 μM . L'augmentation de la concentration ne semble pas avoir d'effet sur le potentiel antiviral de la molécule. Ces résultats, bien qu'encourageants, présentent des disparités entre les différentes expériences et ne nous permettent pas d'atteindre une EC50.

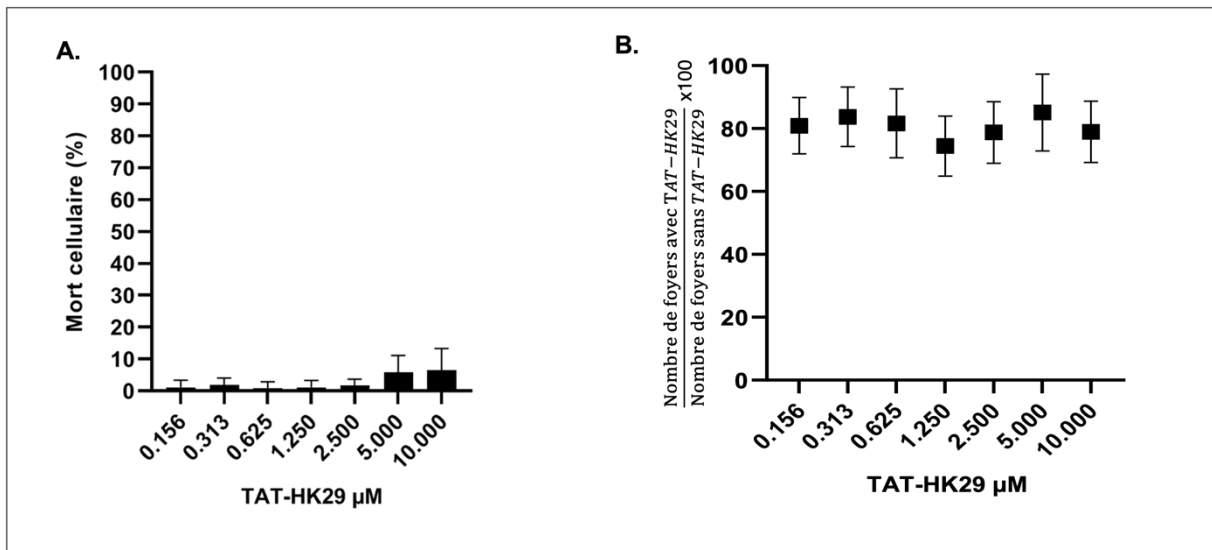


Figure 25 : Évaluation de la toxicité (A) et de l'efficacité (B) du peptide TAT-HK29.

A. Mesure de la toxicité cellulaire associée au peptide TAT-HK29 (4 fois en triplicat). La cytotoxicité est calculée en soustrayant la mort cellulaire spontanée pour chaque condition testée, les résultats ont été exprimés en proportion par rapport au 100 % de mort cellulaire. **B.** Évaluation de l'efficacité du peptide TAT-HK29 par essais antiviraux (4 en triplicat). Le nombre de foyers est compté 5 jours après l'infection et le traitement. Les résultats des différents essais sont normalisés par rapport aux puits témoins non traités et présentés en pourcentage.

Lors des expérimentations, la formation d'agrégats peptidiques est suspectée, cela pourrait être à l'origine des disparités observées. Afin de confirmer cette hypothèse, des observations au microscope inversé sont effectuées (**Figure 26, A et B**). Des agrégats (ou précipités) semblent être identifiés dans du milieu de culture puisqu'aucune structure similaire n'est observée dans le milieu de culture seul.

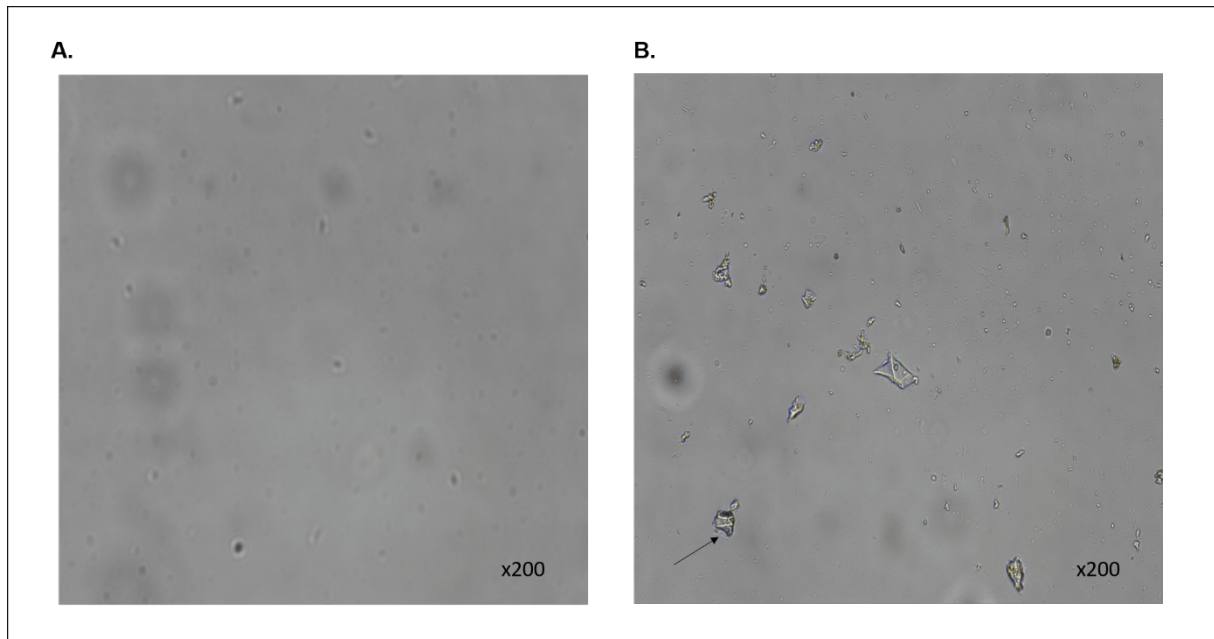


Figure 26 : Observation microscopique du peptide TAT-HK29 dilué ou non dans du milieu de culture. **A.** Observation au microscope inversé du milieu de culture cellulaire seul. **B.** Observation au microscope inversé du peptide TAT-HK29 dilué à 10 μM dans le milieu de culture cellulaire. Grossissement X200. La flèche noire pointe un potentiel agrégat/précipité peptidique.

B – Étude de la protéine pUL52

La protéine pUL52 est essentielle à l'étape d'encapsidation, mais peu de données sont accessibles et son implication dans cette étape demeure inexpliquée. Cette partie de ma thèse vise à identifier et valider des motifs essentiels à la structure ou fonction de pUL52.






La distribution du polymorphisme protéique a été analysée à la suite du séquençage du gène *UL52* de 61 échantillons cliniques de patients naïfs de tout traitement et de 14 échantillons cliniques provenant de patients traités au letermovir. Des alignements de séquences ont été effectués et ont permis de valider la présence de **2 régions variables et de 3 régions conservées**. Des motifs très conservés chez les herpesvirus impliquant des **cystéines et histidines** ont été trouvés dans les régions conservées **I, II et III**. L'importance de ces motifs pour la réplication virale a été validée par la construction de virus recombinants. La modélisation protéique par homologie de séquences de pUL52 nous a permis de visualiser ces motifs au sein de la protéine.

Ainsi, un **doigt de zinc** et deux motifs **CXXC** pouvant être des sites de liaisons ont été démontrés comme étant essentiels pour la réplication virale et probablement pour la structure-fonction de cette protéine. Ces motifs représentent des cibles potentielles pour le développement de nouvelles molécules antivirales.

Ce travail a fait l'objet de **trois communications sous forme de posters** (congrès local, national et international) et d'un **article dans le journal *Viruses*** en 2021.

Communication

New Insights into Human Cytomegalovirus pUL52 Structure

Clotilde Muller ¹, Sophie Alain ^{1,2}, Claire Gourin ¹, Thomas F. Baumert ³, Gaëtan Ligat ^{3,*}
and Sébastien Hantz ^{1,2,*}

- ¹ INSERM, CHU Limoges, University of Limoges, RESINFIT, U1092, F-87000 Limoges, France; clotilde.muller@unilim.fr (C.M.); sophie.alain@unilim.fr (S.A.); claire.gourin@etu.unilim.fr (C.G.)
² CHU Limoges, Laboratoire de Bactériologie-Virologie-Hygiène, National Reference Center for Herpesviruses (NRCHV), F-87000 Limoges, France
³ Institut de Recherche sur les Maladies Virales et Hépatiques, Université de Strasbourg, 67000 Strasbourg, France; thomas.baumert@unistra.fr
 * Correspondence: gligat@unistra.fr (G.L.); sebastien.hantz@unilim.fr (S.H.)

Abstract: Human cytomegalovirus (HCMV) can cause serious diseases in immunocompromised patients. Current antiviral inhibitors all target the viral DNA polymerase. They have adverse effects, and prolonged treatment can select for drug resistance mutations. Thus, new drugs targeting other stages of replication are an urgent need. The terminase complex (pUL56–pUL89–pUL51) is highly specific, has no counterpart in the human organism, and thus represents a target of choice for new antivirals development. This complex is required for DNA processing and packaging, pUL52 was shown to be essential for the cleavage of concatemeric HCMV DNA and crucial for viral replication, but its functional domains are not yet identified. Polymorphism analysis was performed by sequencing *UL52* from 61 HCMV naive strains and from 14 HCMV strains from patients treated with letermovir. Using sequence alignment and homology modeling, we identified conserved regions and potential functional motifs within the pUL52 sequence. Recombinant viruses were generated with specific serine or alanine substitutions in these putative patterns. Within conserved regions, we identified residues essential for viral replication probably involved in CXXC-like or zinc finger motifs. These results suggest that they are essential for pUL52 structure/function. Thus, these patterns represent potential targets for the development of new antivirals.

Keywords: human cytomegalovirus; terminase; DNA-packaging; pUL52; viral targets



Citation: Muller, C.; Alain, S.; Gourin, C.; Baumert, T.F.; Ligat, G.; Hantz, S. New Insights into Human Cytomegalovirus pUL52 Structure. *Viruses* **2021**, *13*, 1638. <https://doi.org/10.3390/v13081638>

Academic Editor: Prashant Desai

Received: 1 July 2021

Accepted: 14 August 2021

Published: 18 August 2021

Publisher's Note: MDPI stays neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.



Copyright: © 2021 by the authors. Licensee MDPI, Basel, Switzerland. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (<https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

1. Introduction

Human cytomegalovirus (HCMV) is a beta-herpesvirus responsible for significant morbidity and mortality in immunocompromised patients and is the leading cause of congenital viral infection [1]. The drugs currently approved against HCMV infection are DNA polymerase (pUL54) inhibitors, including ganciclovir and its prodrug, valganciclovir, cidofovir and foscarnet. Despite their efficiency, the limitations of these drugs are their dose-limiting toxicity and resistances emergence leading to therapeutic challenges [2–5]. New anti-HCMV molecules coming from closer knowledge of novel targets are hence needed for use instead of, or in combination with, current polymerase pUL54 inhibitors. Interestingly, the letermovir received European and U.S. approval for prophylactic use in hematopoietic stem cell transplants in 2017 [6]. The letermovir acts via a novel, not fully understood, mechanism involving at least the viral terminase proteins pUL56, pUL89 and pUL51 and therefore offers a different mode of action. However, resistance mutations were already characterized in vitro and in vivo [7–9].

The terminase complex (pUL56–pUL89–pUL51) is an essential component of the DNA packaging process, which aims to translocate a unit of viral DNA genome into an empty capsid [10]. At least three additional proteins, pUL52, pUL77 and pUL93 seem to be part of the terminase complex and/or participate in the DNA cleavage/packaging

process [11–15]. pUL52 is the gene product of ORF *UL52* located on the unique long portion of the viral genome and is essential for viral replication [12]. pUL52 is composed of 668 amino acids with a molecular mass found at 75KDa and is conserved among the members of the Herpesvirus family. To date, pUL32, the homologous protein in Herpes Simplex type 1 (HSV-1), has been further studied. pUL32 is essential for HSV-1 DNA-packaging, and the generation of viral progeny and its localization in cellular compartments seems to depend on the time of infection. Indeed, at 6 to 9 h post-infection (hpi), the protein pUL32 accumulates in viral replication compartments, while later, at 24 hpi, its localization becomes diffused within the nucleus and the cytoplasm [16]. It was shown by a zinc blot assay that pUL32 binds zinc, but amino acids involved in this binding have not been demonstrated so far [17,18]. However, motifs involving cysteines were shown to be essential for viral replication. This kind of motif could bind zinc. The pUL32 results suggest that this protein may be a chaperone protein that modulates disulfide bond formation during procapsid assembly and maturation [16].

A first study conducted by Borst in 2008 showed that (i) pUL52 does not impact viral DNA replication; (ii) pUL52 is required for the cleavage of concatemeric HCMV DNA; (iii) pUL52 is not essential for capsid formation but is essential for obtaining C capsids; (iiii) pUL52 does not seem to be involved in the nuclear localization of the terminase complex [12]. The pUL52 localization studies did not reveal a dynamic localization pattern. pUL52 was localized around the compartments containing pUL56, with some colocalization being apparent at the boundaries. pUL56 is known to be targeted to replication compartments late in the HCMV infection cycle [19]. Thus, in infected cells, pUL52 encloses the nuclear compartments in which replication and packaging of HCMV genomes take place.

The terminase complex is highly HCMV specific, with no counterpart in mammalian cells, and thus represents a target of choice for the development of new antivirals. An essential role of terminase proteins is assumed; nevertheless, their biological functions remain poorly characterized, and their three-dimensional structure has not yet been resolved. Because knowledge of pUL52 functional domains and interaction sites is essential for the future development of drugs targeting the DNA packaging stage, we applied in this work a primary structure analysis to the full-length pUL52 sequence.

2. Materials and Methods

2.1. Identification of Conserved Patterns and Structure Prediction

The pUL52 amino acids sequences of the HCMV reference strain AD169 strain were aligned with the sequences of 17 homologous proteins from other herpesviruses, as described in Table S1. Alignments were performed using Clustal Omega multiple sequence alignment (MSA) tools provided by the EMBL-EBI bioinformatics web and programmatic tools framework [20–22]. The degree of amino acid conservation is represented as follows: “*” indicates a strictly conserved amino acid; “:” a site belonging to a group exhibiting strong similarity; “.” a site belonging to a group exhibiting a weak similarity. User-identified structural templates selected from the Protein Data Base (PDB) were used to construct full-length atomic models by iterative template fragment assembly simulations (I-TASSER Protein Structure and Function Prediction program) [23–25]. Target function was predicted by threading the 3D model through a protein function database. The amino acid sequence of pUL52 HCMV (DAA00157.1) was submitted, and the final model with the higher confidence score (c-score) was analyzed using VMD 1.9.4 (Visual Molecular Dynamics).

2.2. Cells and Bacterial Strains

Human fibroblasts MRC-5 (bioMérieux, Craaponne, France) were cultivated at 37 °C in 5% CO₂ and grown in minimum essential medium (MEM) supplemented with 10% fetal bovine serum, 50 µg/mL penicillin and 10 µg/mL gentamycin. *E. coli* strain GS1783 was used for BAC mutagenesis [26]. The HCMV-BAC contained an enhanced green fluorescent

protein (EGFP) gene in the unique short region and was derived from parental strain pHB5, the BAC-cloned genome of the HCMV laboratory strain AD169 [27].

2.3. HCMV Strains and Isolates

Five reference strains—AD169 (ATCC VR-538), Davis (ATCC VR-807), Towne (ATCC VR-977) Merlin and Toledo—and 75 HCMV clinical isolates collected from various hospitals in France for the National Reference Center for Herpesviruses were studied. Clinical isolates were from congenital HCMV infected newborns or transplanted patients with HCMV infection. Fourteen of the 75 patients were immunocompromised patients that received letermovir as prophylaxis.

2.4. Amplification and Sequencing of the *UL52* Gene from Reference Strains and Isolates

The full-length *UL52* gene was amplified after DNA extraction (E-Mag, bioMérieux Craponne, France) from isolates by nested PCR using external and internal primers (Table S2). External PCR and internal PCR were both composed of 500ng of DNA (5 μ L of external PCR product for internal PCR), 25 μ L of the 2X Prime START[®] Max DNA polymerase (Takara, Maebashi, Japan), 0.3 nM of primers Ext1/Ext2 or Int1/Int2 (described in Table S2) qsp 50 μ L H₂O PCR grade. The protocol was as follows: an initial denaturation for 5 min at 98 °C then a denaturation for 1 min at 98 °C; 10 s at 98 °C followed by 15 s at 55 °C and 2 min at 72 °C for 45 cycles; a final elongation step for 5 min at 72 °C. After purification of the PCR products using the Wizard[®] SV Gel and PCR Clean-Up System (Promega, Madison, WI, USA) according to the manufacturer's instructions, internal PCR products were directly sequenced using the ABI Prism BigDye[®] Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit in an ABI Prism 3100 Genetic Analyser (Applied Biosystems, Villebon-sur-Yvette, France) with nine sequencing primers designed using Geneious 9.1.8 software. Their specificity was assessed by comparison with GenBank[®]. The sequencing results were analyzed using the Geneious 9.1.8 software by comparison with the AD169 *UL52* sequence.

2.5. Heatmap Generation

The heatmap provides a data matrix where the coloring gives an overview of mutational differences between strains. Python 3.9.6 engine is used to generate this binary heatmap. The strains groups are extracted from the base dataset, and the nature of the mutation is recorded in a dummy variable. The base dataset is converted into a two-dimensional matrix (x,y) with y the "strain" ordered by group and x the "amino acids" ordered by "amino acids" id. The binary heatmap is plotted to show mutations in saddle brown and the absence of a mutation in peach puff.

2.6. *pUL32* HSV-1 Polymorphism Study

Forty-four HSV-1 strains were identified through a sequence similarity search against the HSV-1 pUL32 protein with the NCBI BLAST program. FASTA sequences were analyzed with Geneious 9.1.8 using the Clustal Omega alignment option, and mutations were referenced in an Excel table.

2.7. Bacterial Artificial Chromosome Mutagenesis

To identify the crucial amino acids implied in a putative motif, highly conserved residues were substituted with a serine or an alanine by "en passant" mutagenesis, using a two-step markerless red-recombination system for BAC mutagenesis in *E. coli* strain GS1783. Single *UL52* mutations were introduced into an EGFP-expressing HCMV-BAC [26], yielding several mutants, as described in Table S3. Primers used for mutagenesis are described in Supplementary Table S3. The presence of the introduced mutation in the *UL52* gene was confirmed for each mutant virus by sequencing prior to transfection. We previously showed that "en passant" mutagenesis does not introduce other mutations that could have a negative impact on viral replication [28].

2.8. Reconstitution of HCMV-BAC Viruses Harboring the Mutations

Recombinant HCMV-BAC were purified using NucleoBond™ Xtra Midi system (Macherey-Nagel™, Düren, Germany) following the manufacturer's instructions. To reconstitute virus mutants, purified recombinant BAC were transfected into MRC-5 cells (bioMérieux, France) with the liposomal reagent Transfast™ (Promega, USA) following the manufacturer's instructions. At 11 days post-transfection, transfected cells were transferred on an MRC-5 culture flask to check the impact of each mutation on viral growth. The presence of mutations in the *UL52* gene of each recombinant virus growing in culture was confirmed by sequencing after viral DNA extraction of each strain using the procedure described by Hirt [29].

2.9. Plaque Assays and Growth Curve Analysis

The assessment of the impact of each mutation on viral fitness was performed as previously described [9,28,30]. We inoculated viral recombinant strains and HCMV-BAC AD169 WT in a 48-well MRC-5 culture with a multiplicity of infection (MOI) of 0.01. From day 1 to day 7 post-inoculation, the number of fluorescent cytopathic foci was counted to establish viral growth curves for each recombinant. The absence of contamination was assessed by negative controls and nucleotides polymorphism analysis. The curves represent the average of three independent experiments. For statistical analysis, the Mann–Whitney test was applied. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$.

2.10. Viral Immediate–Early and Late Proteins Expression

Mutated HCMV-BAC were transfected into MRC-5 human fibroblasts using the liposomal reagent Transfast™ (Promega, USA) in a 24 well cell culture plate. At day 5 post-transfection, cells were fixed, and immunostaining was performed for viral immediate–early (anti-IE1 antibody; Argene, Verniolle, France) and late (anti-gB antibody; Abcam, Cambridge, UK) proteins in transfected cells.

3. Results

3.1. Identification of Conserved Regions

Among the 18 herpesviruses studied (Table S1), 23 amino acids were strictly similar, 36 strongly similar and 17 were weakly similar. Sequence alignment in the N-terminal part and in the middle part of pUL52 show a lot of gaps and variability between residues, which is characteristic of a variable region. On the contrary, three regions (numbered I to III) from the residue 200 to 282, 451 to 500 and 555 to 591 stand out for the consequent number of retained residues (Figure 1). Of the 27 cysteines present in pUL52 (4.04%), 16 are in a conserved region and 10 of them are highly conserved. Six cysteines highly conserved are found two amino acid residues apart (CXXC motifs). Two of these motifs (C₂₀₀X₂C₂₀₃ and C₂₂₆X₂C₂₂₉) are in the conserved region I. C₄₅₉X₂C₄₆₂ is in the conserved region II. Another pattern highly conserved involving one histidine and two cysteines is found in region III (H₄₉₅X₂C₄₉₈X₃C₅₀₂). The I-TASSER report indicates a potential ligand-binding site that implicates cysteine and histidine in the region that we found conserved.

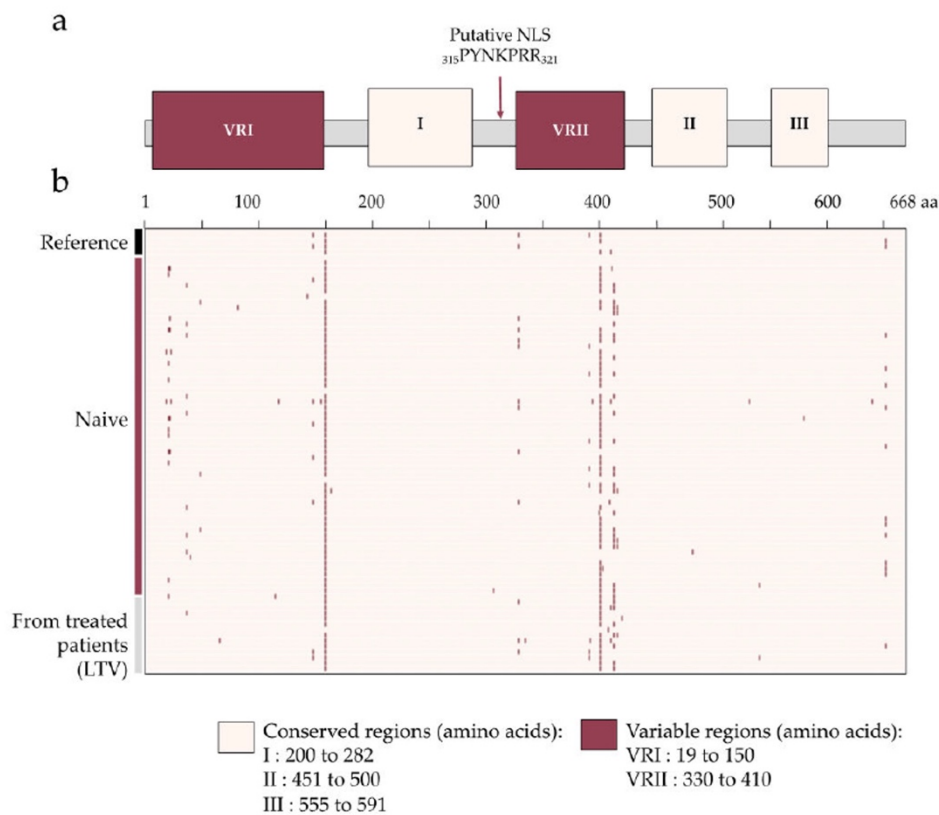


Figure 1. Structure and polymorphism distribution of HCMV pUL52. (a) pUL52 is composed of 3 conserved (I–III) and 2 variable regions (VRI and VR II). A putative nuclear localization signal (NLS) of pUL52 is shown by a red arrow at the amino acid position 315 to 321. (b) Representation through a binary heatmap of the polymorphism distribution according to the strain and the position of the mutation in pUL52. The 3 groups studied (reference strains ($n = 5$), naïve strains ($n = 61$) and strains from patients treated with letermovir (LTV) ($n = 14$) are represented by black, saddle brown and grey boxes, respectively, in the y axis. Mutations are shown in saddle brown and the absence of a mutation in peach puff. VRI and VR II: variable regions I and II. aa: amino acids.

3.2. Identification of Sequence Polymorphisms

The pUL52 sequence of reference strains AD169, Towne and Toledo were identical to the sequences found in GenBank (accession number FJ527563.1, GQ121041.1, GU937742), and inter-assay reproducibility was 100%. Among the 61 naïve strains sequenced, we described 36 amino acid polymorphisms distributed across pUL52. Seven are also present in the reference strains Towne, Toledo, Davis or Merlin. The mean identity of the HCMV isolates was 99.4% (range: 98.2–100%), and the mean number of polymorphisms per isolates was 3.4 (range: 0 to 12). Analysis of polymorphism repartition through pUL52 revealed two parts with a huge concentration of mutations which are consistent with the alignment where gaps and variability were found. These two variable regions are annotated as pUL52 VRI and VR II. Of the 61 naïve strains studied, mutations do not affect areas identified as functional. Only two mutations are found once in a conserved region: V482L in region II (451 to 500) and V580I in region III (555 to 591). Sequence alignment showed that these

two residues are not conserved among herpesviruses. Conserved and variable regions identified by alignment can overlap with the natural polymorphism identified in pUL52 isolates (Figure 1). In the sequences of the 14 strains from patients treated with letermovir, 18 mutations were found: seven were common to reference strains, five to naive strains and six never described (L66F; G115V; E335Q; S392P; del408; H420N). L66F and G115V are in the variable region I and S392P, del408, H420N in the variable region II. The residue E335 is close to the putative NLS described by Borst [12]. However, this amino acid is not conserved between herpesviruses and beta-herpesviruses, and none of these mutations were found in one of the three regions determined as conserved.

3.3. pUL32 Polymorphism Is Consistent with pUL52

The polymorphism of the HSV-1 pUL32 protein, the HCMV pUL52 homolog, was studied from 44 different strains found in Genbank[®]: 42 mutations were found through the 596 amino acids that composed pUL32. The polymorphism distribution reveals a variable region from amino acid 0 to 100 and a second longer variable region from amino acid 250 to 390 (Figure 2a). These two variable regions are consistent with the regions described in pUL52. Four motifs, ¹²⁸CXXC₁₃₁, ¹⁵⁵CXXC₁₅₈, ⁴²³CXXC₄₂₆ and ⁴⁹⁵HXXCXXC₅₀₂, described by Albright et al., are not in polymorphism-rich regions and are conserved between the three Herpesvirus subfamilies [16]. Only the ²⁹¹CXXXXC₂₉₇ motif is located in a polymorphism-rich region that we called VR11. This motif is only found in alpha-herpesviruses (Figure 2b).

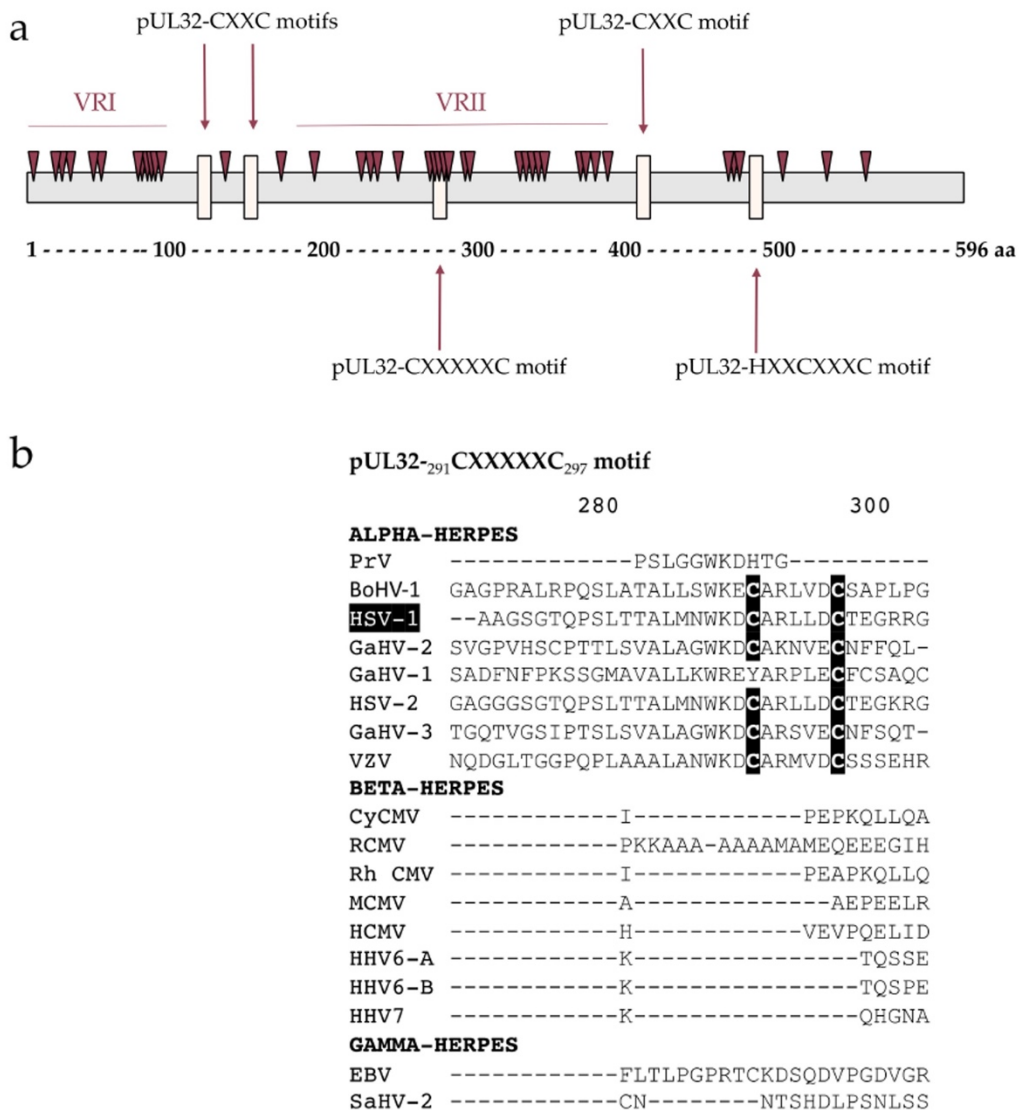


Figure 2. Distribution of the polymorphism through the HSV-1 pUL32 protein and motifs previously described by All in 2015. (a) pUL32 strains were identified through a sequence similarity search against pUL32 using the NCBI B program. The 44 pUL32 HSV-1 strains were aligned using Clustal W alignment with Geneious 9.1.8 software. mutation is annotated as a saddle brown triangle. Motifs previously described are represented with a peach puff rect (b) Sequence alignment from 18 herpesviruses of the pUL32₋₂₉₁CXXXXXC₂₉₇ motif. Sequence numbering is consistent that of HSV-1 strain residues. Key residues involved in the CXXXXXC motif are shown as white letters on black background. VRI and VRII: variable regions I and II. aa: amino acids.

3.4. Analysis of Conserved Region I Revealed Putative Metal-Binding Sites

The alignment of the conserved region I with 17 homologs from herpesviruses showed that, over the length, 17 residues are conserved. Nine of them are perfectly conserved (C200, C203, Y222, C226, D272, H276, F277, C282, F283), and eight are semi-conserved,

mainly nonpolar residues (5 aliphatics: V/L/I202, V/L/I206, L/I225, V/L/I259, V/L/I268; one aromatic W/F217; two polar negatively charged D/E220, D/E245). In this highly conserved region rich in cysteines, two CXXC motifs are found 22 amino acid residues apart: ²⁰⁰CXXC₂₀₃ and ²²⁶CXXC₂₂₉. A region between these motifs is particularly conserved from amino acid 217 to 222 with a W/F-X-X-D/E-Y type sequence (Figure 3b). We are in the presence of a cyclic amino acid separated by two negatively charged residues, directly followed by a tyrosine. The amino acid sequence of pUL52 HCMV was submitted in I-TASSER to further investigate the pUL52 theoretical structure. The predictive secondary structure of the conserved region I is composed of a helix with a high confidence score. To better visualize the motif, the conserved region is selected with VMD 1.9.4. The shape of this region is typical of a zinc finger, cysteine C200, C203, C226 and C229 could be implicated in this shape, and the conserved amino acids 217 to 222 may constitute the binding site of the zinc finger. (Figure 3c). The strictly conserved residues H276 and C282 are very close to the four cysteines C200, C203, C226 and C229 and could also be implicated. I-TASSER data considered this motif as a predictive zinc-binding site. To further investigate the implication of these residues in a putative zinc-finger motif, we produced by “*en passant*” mutagenesis recombinant EGFP-viruses (C200S, C203S, C226S, C229S, H276A, C282S). Eleven days after transfection in human fibroblasts, no cytopathogenic effect was observed for mutations C200S, C203S, C226S, H276A and C282S located within the putative metal-binding site (Figure 3d, Figure S1). The HCMV-BAC UL52 C229S can replicate in human fibroblasts. However, C229S mutation significantly reduced the virus capacity to produce infectious particles, showing that C229 is an important amino acid for HCMV replication fitness (Figure 3e).

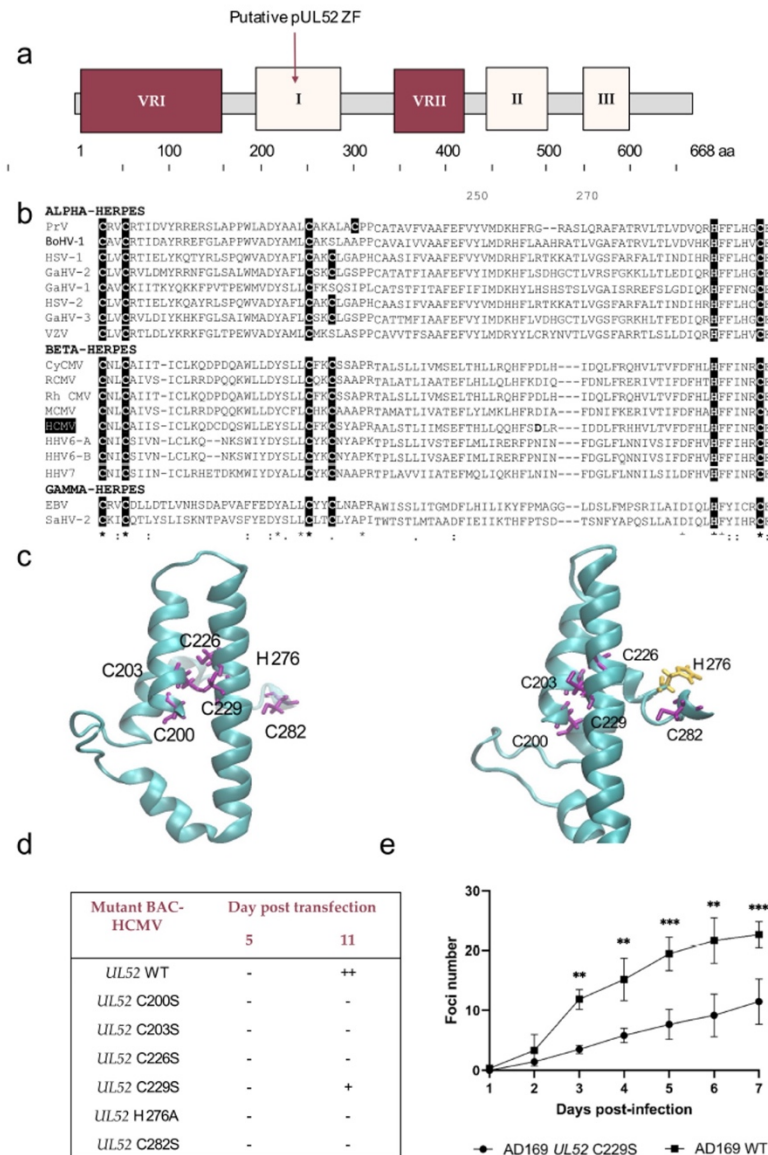


Figure 3. Identification of a putative zinc-finger motif within pUL52 protein. (a) Structure of HCMV pUL52 with a putative zinc-finger (ZF) pattern (VRI and VRII: variable regions I and II). (b) Sequence alignment of the conserved region I from 18 herpesviruses and residues involved in a metal-binding site. Sequence numbering is consistent with that of HCMV reference strain AD169 residues. Key residues involved in the formation of the zinc-finger motif are shown as white letters on black background. (c) The region I was extracted from the pUL52 theoretical structure. Cysteines are represented in purple, histidine H276 in yellow. (d) Impact of HCMV-BAC-UL52 mutants on growth in cell culture at day 11 (fibroblasts MRC-5). (e) Growth curves of the recombinant virus strain HCMV-BAC-UL52-C229S in comparison to the parental strain HCMV-BAC AD169 WT. Fluorescent foci were counted daily from day 1 to day 7. Curves are the average of three independent experiments. ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$ (Mann–Whitney test). VRI and VRII: variable regions I and II. aa: amino acid.

3.5. Analysis of Conserved Region II

The conserved region II is composed of 49 residues from 451 to 500 (Figure 4a). Four residues are strictly conserved, eight are strongly conserved and three are weakly. Of the four residues strictly conserved, two cysteines are found two residues apart (Figure 4b). It corresponds to a CXXC motif. This ⁴⁵⁹CXXC₄₆₂ motif is consistent with the ⁴²³CXXC₄₂₆ motif of pUL32. HCMV-BAC-UL52-C459S and HCMV-BAC-UL52-C462S were produced, and eleven days after transfection in human fibroblasts, no cytopathogenic effect was observed for these two mutations, indicating the importance of this motif for viral replication and thus for protein function (Figure 4c). A mutation of region II found in one of the 61 naïve strains (V482L) is not conserved between herpesviruses studied (Figure 4b, Figure S1).

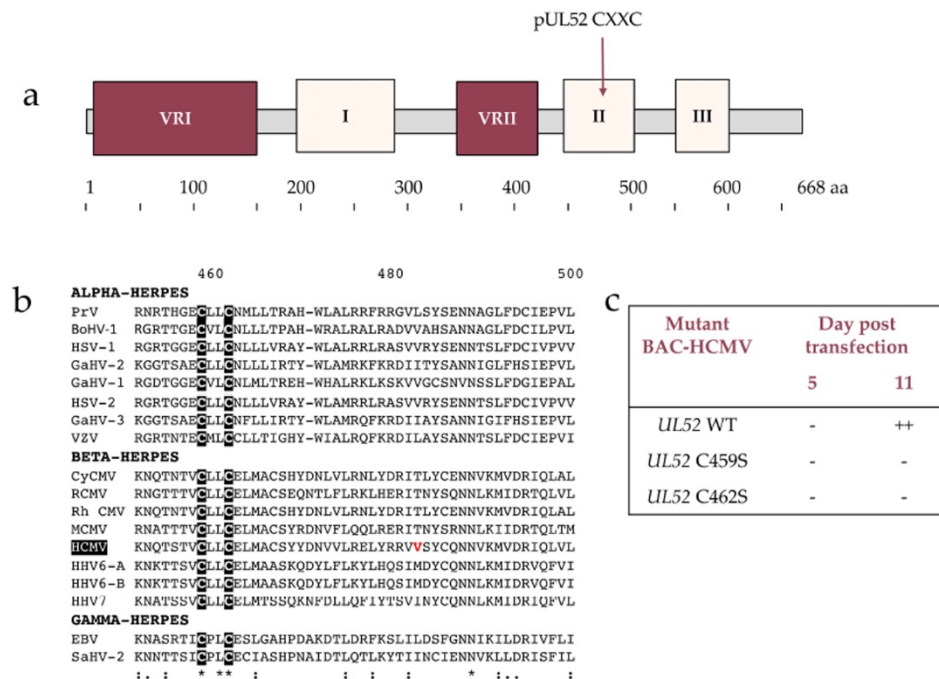


Figure 4. CXXC-like motif in conserved Region II. (a) Structure of HCMV pUL52 with a CXXC motif. (b) Sequence alignment of the conserved region II from 18 herpesviruses and residues involved in a CXXC motif. Sequence numbering is consistent with that of HCMV reference strain AD169 residues. Key residues involved in the formation of the CXXC motif are shown as white letters on black background. (c) Impact of HCMV-BAC-UL52 mutants on growth in cell culture at day 11 (fibroblasts MRC-5). VRI and VRII: variable regions I and II. aa: amino acid.

3.6. Analysis of Conserved Region III

The conserved region III ranges from residue 555 to residue 591 (Figure 5a). This high conserved region is composed of six amino acids strictly conserved (K566, H567, F569, D571, C574, L590), three strongly (L555, F568, F591) and two weakly (I564, Y565). A motif involving H567, C570 and C574 is like those previously described in pUL32 ⁴⁹⁵HXXC**XXXX**₅₀₂ and predicted in alpha-helix (Figure 5b,c). Only the RCMV-pUL52 and MCMV-pUL52 do not have this motif strictly conserved in the other 17 homologs (Figure 5b). These two homologs have a threonine or an alanine instead of the cysteine present in the other herpesviruses studied. At 11 days post-transfection of the HCMV-BAC-UL52-C567S and HCMV-BAC-UL52-C574S, no foci were observed indicating

the importance of these residues (Figure 5d, Figure S1). The HCMV-BAC-UL52-C570S did not show foci at day 11 but the passage in a flask culture allowed to observe a slight growth. The virus growth was slow, showing that C570 has an impact on HCMV replication fitness (Figure 5e). A mutation of region III found in one of the 61 naïve strains (V580I) is not conserved among herpesviruses studied (Figure 5b).

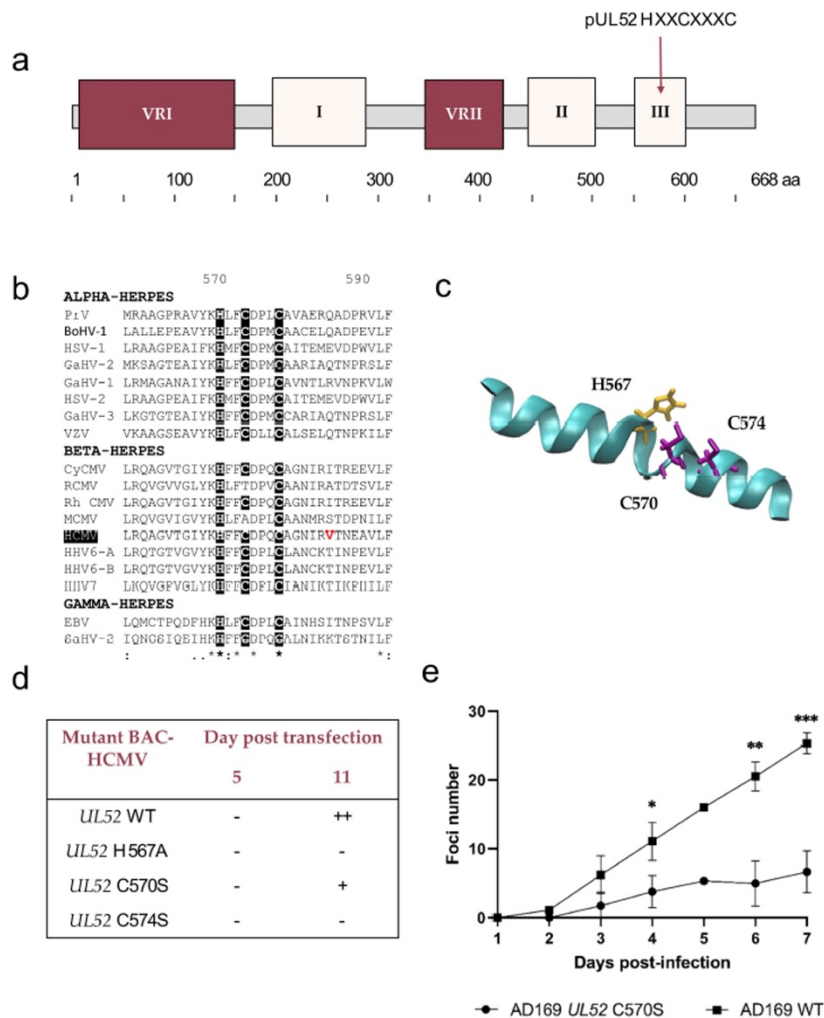


Figure 5. HXXCXXXC motif in conserved Region III. (a) Structure of HCMV pUL52 with an HXXCXXXC motif. (b) Sequence alignment of the conserved region III from 18 herpesviruses and residues involved in an HXXCXXXC motif. Sequence numbering is consistent with that of HCMV reference strain AD169 residues. Key residues involved in the formation of the HXXCXXXC motif are shown as white letters on black background. The residue in red matches the position of the mutation V580I found in one of the 61 naïve strains. (c) Region 3 was extracted from the pUL52 theoretical structure. Cysteines and histidine are represented in purple and yellow, respectively. (d) Impact of HCMV-BAC-UL52 mutants on growth in cell culture at day 11 (fibroblasts MRC-5). (e) Growth curves of the recombinant virus strain HCMV-BAC-UL52-C570S in comparison to the parental strain HCMV-BAC AD169 WT. Fluorescent foci were counted daily from day 1 to day 7. Curves are the average of three independent experiments. * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$ (Mann-Whitney test). VRI and VR II: variable regions I and II. aa: amino acid.

3.7. pUL52 Mutations Do Not Impact the Viral Gene Expression

Expression of immediate-early and late viral genes were detected by immunostaining 5 days after transfection in human fibroblast, indicating that the different recombinant viruses built for testing the impact of amino acids mutations on viral replication did not impact the expression of the viral genes (Figure S2).

4. Discussion

HCMV is responsible for significant morbidity and mortality in immunocompromised patients and in congenitally infected neonates. pUL52 was shown to be essential for the cleavage of concatemeric HCMV DNA and crucial for viral replication. To date, its functional domains were not identified.

Taken together, our results confirmed that the amino acids sequence of pUL52 is highly conserved among HCMV reference strains and clinical isolates, with an average sequences identity of 99.4%. Comparison of the HCMV pUL52 sequence with its homologs showed three highly conserved regions and two variable regions (Figure 6a). By studying polymorphism, we were able to refine the conserved and variable regions initially described by the sequence alignment. Two regions are rich in polymorphisms. The first one is located in the N-term from amino acid 19 to amino acid 150, and the second is the middle part of the protein from amino acid 330 to 410. They are consistent with the variable regions defined by the alignment of pUL52 homologs. Only two mutations are found in the three conserved regions identified (V482L in region II and V580I region III). These two amino acids are not conserved in herpesviruses, and mutations V to I or V to L do not change the amino acid properties. Within a highly conserved protein, these results suggest that these regions (VRI and VRII) correspond to non-functional regions of pUL52. In contrast, the conservation of regions I to III indicates their likely involvement in specific enzymatic functions of pUL52 or in the conservation of its three-dimensional structure.

Interestingly, analysis of HSV-1 pUL32 sequences from 44 strains retrieved from the Genbank[®] reveals more diffuse polymorphisms than in HCMV-pUL52. In general, the polymorphism is like that of pUL52, and these results were found with sequence alignment. Indeed, sequence alignment in the N-terminal part and in the middle part showed a lot of gaps and variability between residues. It appears that these two variable regions identified in HSV-1 and HCMV have the same location. It is unlikely that an essential function would be associated with these regions. Four motifs CXXC were described in pUL32; three of them are located in the most conserved regions. One of the four motifs is found in a region rich in polymorphisms (VRII), and this motif is not conserved in beta- and gamma-herpesviruses. In addition, the mutation of *UL32-C291A* does not lead to a loss of viral replication. Thus, the essential character of this motif was not validated to date [16].

Alignment with herpesviruses highlights a large, conserved region that we called conserved region I. A polymorphism study between 75 HCMV strains revealed no mutations in this region. This region is rich in cysteine and histidine (15.6%) and can have zinc-binding sites. In the same way, I-TASSER report indicated the potential implication of the C200, C203, C226, C229 or C200, C203, H276 and C282 in the zinc-binding sites. The shape of this region visualized with VMD 1.9.4 showed a typical shape of the zinc finger with C200, C203, C226, C229. We hypothesize a zinc finger implicating the four cysteines C200, C203, C226, C229. This motif was discovered in various DNA binding proteins such as the T4 phage terminase complex protein: the gp49 protein [31]. To further study the implication of cysteine and histidine, recombinant viruses were built. Only the C229S mutant can replicate, but the viral fitness is impacted compared to the reference strain AD169. This shows the importance of these amino acids for viral replication. We can hypothesize that these mutations affect the function of the protein, probably preventing interaction with viral DNA.

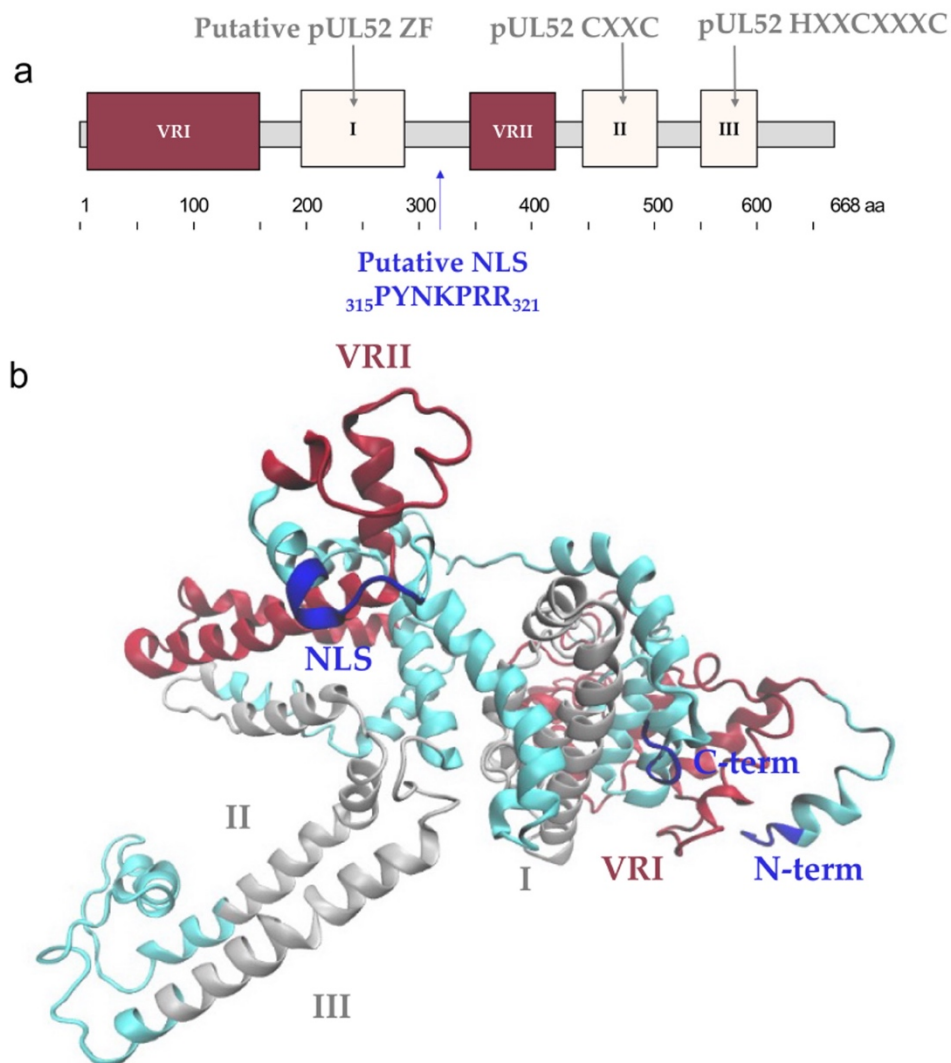


Figure 6. Structure of pUL52. (a) Structure of HCMV pUL52 with conserved and variable regions. The putative zinc-finger (ZF), CXXC and HXXCXXXC patterns are in the conserved regions I, II, III, respectively. (b) Predictive atomic structure of pUL52. The amino acid sequence of pUL52 HCMV (DAA00157.1) was submitted in I-TASSER (Iterative Template fragment Assembly Simulations), and the final model with the higher confidence score (c-score) was analyzed using VMD 1.9.4 (Visual Molecular Dynamics). Variable and conserved regions determined by polymorphism and sequence alignment analysis are represented in saddle brown and grey, respectively. The putative NLS $_{315}\text{PYNKPRR}_{321}$, N-term and C-term are represented in blue. VRI and VRII: variable regions I and II. aa: amino acid.

The conserved regions II and III are delimited as follows: region II from residue 451 to residue 500 and region III from residue 555 to residue 591. According to *in silico* reconstruction of the whole protein using I-TASSER, region II from amino acid 480 to 500 and region III from amino acid 555 to 591 are close and could be in favor of interactions (Figure 6b). These two high conserved regions are composed of motif implicating cysteines.

In region II we found the ⁴⁵⁹CXXC₄₆₂ motif, and in region III, the ⁵⁶⁷HXXCXXXC₅₇₄ that are consistent with the ⁴²³CXXC₄₂₆ motif and the ⁴⁹⁵HXXCXXXC₅₀₂ motif found in HSV-1 pUL32. Substitution of these cysteine/histidine in serine or alanine in an HCMV-BAC-AD169 allowed us to validate the importance of the residues C459, C462, H567 and C574 for viral replication. The HCMV-BAC with UL52-C570 serine substitution affects the viral growth. Interestingly, this cysteine is not strictly conserved in other herpesviruses, and the same results are shown with the substitution of the UL32-C498 in alanine.

Sequence alignment between the eight beta-herpesviruses showed a particularly conserved C-terminal region from residue 617 to residue 668. This region is rich in amino acids with an amino group contained in the side chain: arginine and lysine. This region is poor in polymorphisms. The mutation S652N is found in the reference strains Merlin and Toledo and most of the studied strains. Another mutation, A640T, is found in one naïve strain. These mutations do not concern conserved amino acids. The first study of pUL52 showed that the C-terminal part of this protein is essential for its function and for its correct localization [12]. They assumed the presence of a putative NLS at positions 315 to 321. Because of the importance of the C-terminal part and given the sequence alignment of this part in beta-herpesviruses, we can assume the presence of a second NLS from the amino acid composition of this region.

Collectively, our study provides new insights into the pUL52 structure and will contribute to a better understanding of the pUL52 function. In addition, the study of pUL52 polymorphisms and conserved domains should facilitate the identification of resistance mutations to the inhibitor of terminase complex when they occur in clinical practice. Finally, our data pave the way for the identification of previously undiscovered antiviral targets and the development of drugs urgently needed.

Supplementary Materials: The following are available online at <https://www.mdpi.com/article/10.3390/v13081638/s1>, Table S1: Sequences used for alignment of pUL52 homologs. Table S2: Primers used for UL52 amplification and sequencing. Table S3: Primers used for HCMV-BAC recombinant viruses construction. Figure S1. Plaque formation assay in MRC-5 cells after transfection of HCMV-BAC GFP UL52 WT (AD169) or recombinant virus strains for the conserved region I, II and III. Figure S2. pUL52 is not required for viral late gene expression.

Author Contributions: G.L. and S.H. designed the research. C.M. performed experiments, analyzed the statistical, wrote the manuscript and prepared the figures. C.G. participated in research experiments. S.A. and T.F.B. reviewed the manuscript. G.L. and S.H. coordinated the research and manuscript writing. All authors have read and agreed to the published version of the manuscript.

Funding: This work was granted by Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche, Conseil Régional de Nouvelle-Aquitaine and Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale (Inserm). G.L. is the recipient of an ANRS fellowship (ECTZ86820 and ECTZ158023). This study has been funded by a Research Grant 2021 from the European Society of Clinical Microbiology and Infectious Diseases (ESCMID) to G.L.

Institutional Review Board Statement: Not applicable.

Informed Consent Statement: Not applicable.

Data Availability Statement: The data are available from the corresponding authors upon reasonable request.

Acknowledgments: The authors acknowledge E. Guérin and V. Tilloy from the technical facilities and Florent Di Meo and Gaëtan Muller for their assistance.

Conflicts of Interest: The authors declare no conflict of interest. The funders had no role in study design, data collection and interpretation, or the decision to submit the work for publication.

References

1. Rubin, R.H. Prevention of Cytomegalovirus Infection in Organ Transplant Recipients. *Transpl. Infect. Dis.* **2000**, *2*, 99–100. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
2. Leruez-Ville, M.; Ville, Y. Fetal Cytomegalovirus Infection. *Best Pract. Res. Clin. Obs. Gynaecol.* **2017**, *38*, 97–107. [[CrossRef](#)]

3. Lurain, N.S.; Chou, S. Antiviral Drug Resistance of Human Cytomegalovirus. *Clin. Microbiol. Rev.* **2010**, *23*, 689–712. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
4. El Chaer, F.; Shah, D.P.; Chemaly, R.F. How I Treat Resistant Cytomegalovirus Infection in Hematopoietic Cell Transplantation Recipients. *Blood* **2016**, *128*, 2624–2636. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
5. Andouard, D.; Mazon, M.-C.; Ligat, G.; Couvreur, A.; Pouteil-Noble, C.; Cahen, R.; Yasdanpanah, Y.; Deering, M.; Viget, N.; Alain, S.; et al. Contrasting Effect of New HCMV PUL54 Mutations on Antiviral Drug Susceptibility: Benefits and Limits of 3D Analysis. *Antivir. Res.* **2016**, *129*, 115–119. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
6. Marty, F.M.; Ljungman, P.; Chemaly, R.F.; Maertens, J.; Dadwal, S.S.; Duarte, R.F.; Haider, S.; Ullmann, A.J.; Katayama, Y.; Brown, J.; et al. Letermovir Prophylaxis for Cytomegalovirus in Hematopoietic-Cell Transplantation. *N. Engl. J. Med.* **2017**, *377*, 2433–2444. [[CrossRef](#)]
7. Chou, S.; Satterwhite, L.E.; Ercolani, R.J. New Locus of Drug Resistance in the Human Cytomegalovirus UL56 Gene Revealed by *In Vitro* Exposure to Letermovir and Ganciclovir. *Antimicrob. Agents Chemother.* **2018**, *62*. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
8. Chou, S. A Third Component of the Human Cytomegalovirus Terminase Complex Is Involved in Letermovir Resistance. *Antivir. Res.* **2017**, *148*, 1–4. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
9. Ligat, G.; Cazal, R.; Hantz, S.; Alain, S. The Human Cytomegalovirus Terminase Complex as an Antiviral Target: A Close-up View. *FEMS Microbiol. Rev.* **2018**, *42*, 137–145. [[CrossRef](#)]
10. Muller, C.; Alain, S.; Baumert, T.F.; Ligat, G.; Hantz, S. Structures and Divergent Mechanisms in Capsid Maturation and Stabilization Following Genome Packaging of Human Cytomegalovirus and Herpesviruses. *Life* **2021**, *11*, 150. [[CrossRef](#)]
11. Borst, E.M.; Kleine-Albers, J.; Gabaev, I.; Babić, M.; Wagner, K.; Binz, A.; Degenhardt, I.; Kalesse, M.; Jonjić, S.; Bauerfeind, R.; et al. The Human Cytomegalovirus UL51 Protein Is Essential for Viral Genome Cleavage-Packaging and Interacts with the Terminase Subunits PUL56 and PUL89. *J. Virol.* **2013**, *87*, 1720–1732. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
12. Borst, E.M.; Wagner, K.; Binz, A.; Sodeik, B.; Messerle, M. The Essential Human Cytomegalovirus Gene UL52 Is Required for Cleavage-Packaging of the Viral Genome. *J. Virol.* **2008**, *82*, 2065–2078. [[CrossRef](#)]
13. Borst, E.M.; Bauerfeind, R.; Binz, A.; Stephan, T.M.; Neuber, S.; Wagner, K.; Steinbrück, L.; Sodeik, B.; Lenac Roviš, T.; Jonjić, S.; et al. The Essential Human Cytomegalovirus Proteins PUL77 and PUL93 Are Structural Components Necessary for Viral Genome Encapsidation. *J. Virol.* **2016**, *90*, 5860–5875. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
14. DeRussy, B.M.; Tandon, R. Human Cytomegalovirus PUL93 Is Required for Viral Genome Cleavage and Packaging. *J. Virol.* **2015**, *89*, 12221–12225. [[CrossRef](#)]
15. Köppen-Rung, P.; Dittmer, A.; Bogner, E. Intracellular Distribution of Capsid-Associated PUL77 of Human Cytomegalovirus and Interactions with Packaging Proteins and PUL93. *J. Virol.* **2016**, *90*, 5876–5885. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
16. Albright, B.S.; Kosinski, A.; Szczepaniak, R.; Cook, E.A.; Stow, N.D.; Conway, J.F.; Weller, S.K. The Putative Herpes Simplex Virus 1 Chaperone Protein UL32 Modulates Disulfide Bond Formation during Infection. *J. Virol.* **2015**, *89*, 443–453. [[CrossRef](#)]
17. Chang, Y.E.; Poon, A.P.; Roizman, B. Properties of the Protein Encoded by the UL32 Open Reading Frame of Herpes Simplex Virus 1. *J. Virol.* **1996**, *70*, 3938–3946. [[CrossRef](#)]
18. Lamberti, C.; Weller, S.K. The Herpes Simplex Virus Type 1 Cleavage/Packaging Protein, UL32, Is Involved in Efficient Localization of Capsids to Replication Compartments. *J. Virol.* **1998**, *72*, 2463–2473. [[CrossRef](#)]
19. Giesen, K.; Radsak, K.; Bogner, E. The Potential Terminase Subunit of Human Cytomegalovirus, PUL56, Is Translocated into the Nucleus by Its Own Nuclear Localization Signal and Interacts with Importin α . *J. Gen. Virol.* **2000**, *81*, 2231–2244. [[CrossRef](#)]
20. Sievers, F.; Wilm, A.; Dineen, D.; Gibson, T.J.; Karplus, K.; Li, W.; Lopez, R.; McWilliam, H.; Remmert, M.; Söding, J.; et al. Fast, Scalable Generation of High-Quality Protein Multiple Sequence Alignments Using Clustal Omega. *Mol. Syst. Biol.* **2011**, *7*, 539. [[CrossRef](#)]
21. McWilliam, H.; Li, W.; Uludag, M.; Squizzato, S.; Park, Y.M.; Buso, N.; Cowley, A.P.; Lopez, R. Analysis Tool Web Services from the EMBL-EBI. *Nucleic Acids Res.* **2013**, *41*, W597–W600. [[CrossRef](#)]
22. Li, W.; Cowley, A.; Uludag, M.; Gur, T.; McWilliam, H.; Squizzato, S.; Park, Y.M.; Buso, N.; Lopez, R. The EMBL-EBI Bioinformatics Web and Programmatic Tools Framework. *Nucleic Acids Res.* **2015**, *43*, W580–W584. [[CrossRef](#)]
23. Roy, A.; Kucukural, A.; Zhang, Y. I-TASSER: A Unified Platform for Automated Protein Structure and Function Prediction. *Nat. Protoc.* **2010**, *5*, 725–738. [[CrossRef](#)]
24. Yang, J.; Yan, R.; Roy, A.; Xu, D.; Poisson, J.; Zhang, Y. The I-TASSER Suite: Protein Structure and Function Prediction. *Nat. Methods* **2015**, *12*, 7–8. [[CrossRef](#)]
25. Yang, J.; Zhang, Y. I-TASSER Server: New Development for Protein Structure and Function Predictions. *Nucleic Acids Res.* **2015**, *43*, W174–W181. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
26. Borst, E.-M.; Hahn, G.; Koszinowski, U.H.; Messerle, M. Cloning of the Human Cytomegalovirus (HCMV) Genome as an Infectious Bacterial Artificial Chromosome in Escherichia Coli: A New Approach for Construction of HCMV Mutants. *J. Virol.* **1999**, *73*, 10. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
27. Chee, M.S.; Bankier, A.T.; Beck, S.; Bohni, R.; Brown, C.M.; Cerny, R.; Horsnell, T.; Hutchison, C.A.; Kouzarides, T.; Martignetti, J.A. Analysis of the Protein-Coding Content of the Sequence of Human Cytomegalovirus Strain AD169. *Curr. Top. Microbiol. Immunol.* **1990**, *154*, 125–169. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
28. Ligat, G.; Jacquet, C.; Chou, S.; Couvreur, A.; Alain, S.; Hantz, S. Identification of a Short Sequence in the HCMV Terminase PUL56 Essential for Interaction with PUL89 Subunit. *Sci. Rep.* **2017**, *7*. [[CrossRef](#)]

29. Hirt, B. Selective Extraction of Polyoma DNA from Infected Mouse Cell Cultures. *J. Mol. Biol.* **1967**, *26*, 365–369. [[CrossRef](#)]
30. Ligat, G.; Couvreur, A.; Cazal, R.; Alain, S.; Hantz, S. Highlighting of a LAGLIDADG and a Zinc Finger Motifs Located in the PUL56 Sequence Crucial for HCMV Replication. *Viruses* **2019**, *11*, 1093. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
31. Champier, G.; Couvreur, A.; Hantz, S.; Rametti, A.; Mazon, M.-C.; Bouaziz, S.; Denis, F.; Alain, S. Original Article Putative Functional Domains of Human Cytomegalovirus PUL56 Involved in Dimerization and Benzimidazole D-Ribonucleoside Activity. *Antivir. Ther.* **2008**, *13*, 643–654. [[PubMed](#)]

New insights into human cytomegalovirus pUL52 structure

Clotilde Muller¹, Sophie Alain^{1,2}, Claire Gourin¹, Thomas F. Baumert³, Gaëtan Ligat³, †,*, Sébastien Hantz^{1,2}, †,*

¹Univ. Limoges, INSERM, CHU Limoges, RESINFIT, U1092, F-87000 Limoges, France

²CHU Limoges, Laboratoire de Bactériologie-Virologie-Hygiène, National Reference Center for Herpesviruses (NRCHV), F-87000 Limoges, France

³Institut de Recherche sur les Maladies Virales et Hépatiques, Université de Strasbourg, 67000 Strasbourg, France

†These authors contributed equally

*Corresponding author:

gligat@unistra.fr (G.L.); sebastien.hantz@unilim.fr (S.H.)

SUPPLEMENTARY DATA

Table S1: Sequences used for alignment of pUL52 homologs.

Identification	Virus	Protein	Length residues	Accession number
PrV	Suid alphaherpesvirus 1	pUL32	470	>YP_068335.1
BoHV-1	Bovine alphaherpesvirus 1	pUL32	601	>NP_045326.1
HSV-1	Human herpesvirus 1	pUL32	596	>NP_044634.1
GaHV-1	Gallid alphaherpesvirus 1	pUL32	582	>YP_182361.1
GaHV-2	Gallid herpesvirus 2	pUL32	641	>NP_057791.1
HSV-2	Human herpesvirus 2	pUL32	598	>NP_044502.1
GaHV-3	Gallid alphaherpesvirus 3	pUL32	626	>NP_066864.1
VZV	Human alphaherpesvirus 3	pUL32	585	>NP_040149.1
CyCMV	Cynomolgus cytomegalovirus	Cy83	552	>YP_009337502.1
RCMV	Rat cytomegalovirus Maastricht	pR52	530	>NP_064158.1
RhCMV	Macacine betaherpesvirus 3	Rh83	551	>YP_068176.1
MCMV	Murid betaherpesvirus 1	M52	517	>AWV68147.1
HCMV	Human betaherpesvirus 5	pUL52	668	>DAA00157.1
HHV6-A	Human betaherpesvirus 6A	U36	484	>NP_042929.1
HHV6-B	Human betaherpesvirus 6B	Virion protein	484	>NP_050217.1
HHV7	Human betaherpesvirus 7	pUL32	485	>YP_073776.1
EBV	Human herpesvirus 4	pUL32	525	>NP_039846.1
SaHV-2	Saimiriine gammaherpesvirus 2	unnamed protein	436	>NP_040270.1

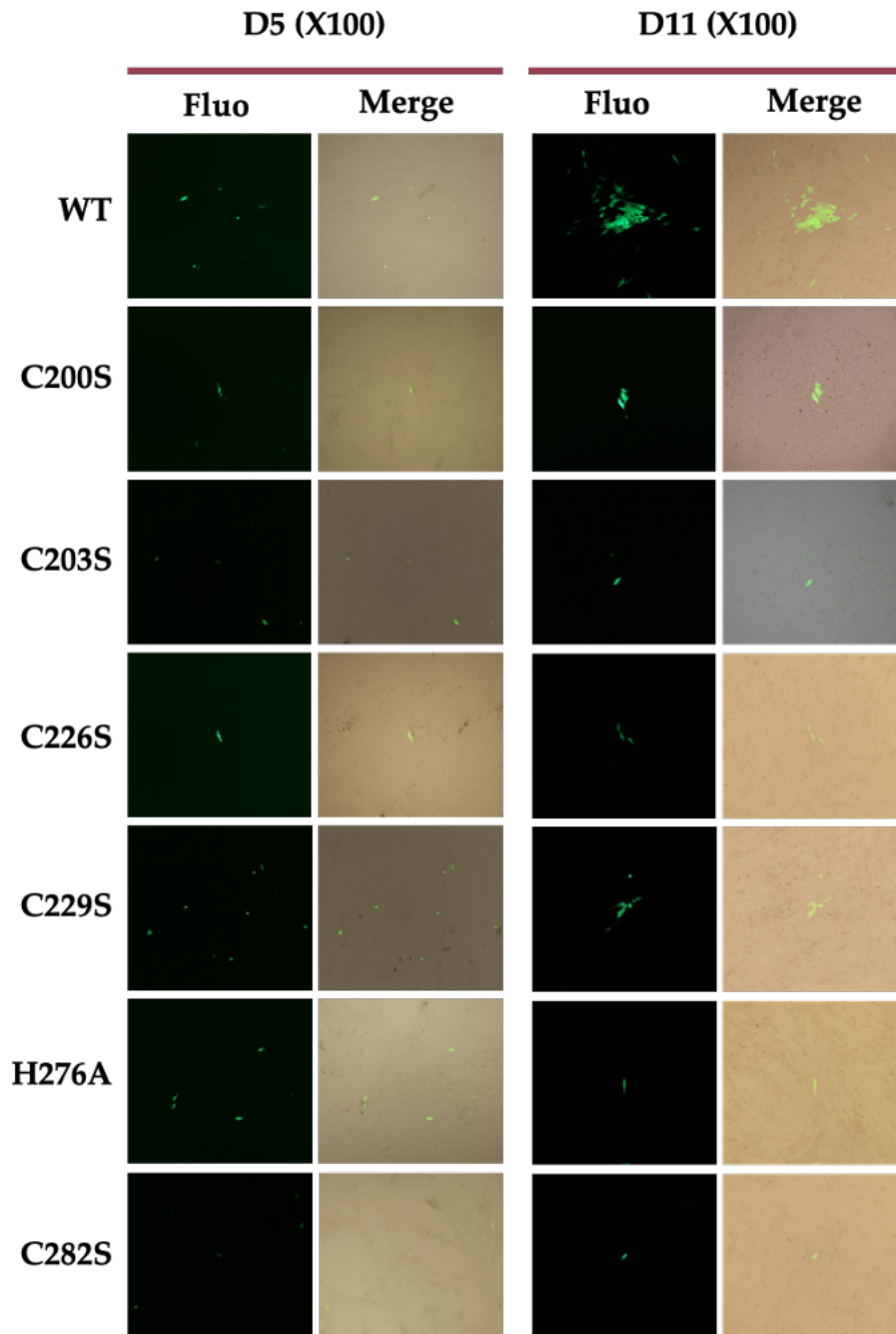
Table S2: Primers used for *UL52* amplification and sequencing.

Primers	Sequence 5' → 3'
UL52-2 For	GCACGCGCACCCGCGTCA
UL52-3 Rev	GTGGTGTGGTTCGCATTGG
UL52-4 For	GCTTCGGCCGCCTGCGACCT
UL52-4_5 Rev	CGAAGCGGTCGCGGCTAGGTG
UL52-5 For	TGGGCCGGCACCCGGCGTCAT
UL52-6 Rev	TGCGGGTCGCAGAAAAAGTG
UL52-7 For	CGTCAGGCAGGCGTCACGGG
UL52- Int1	CCAGAAACGGCACCCGCTGC
UL52- Int2	GGGTGCTCGCGGAAGATGTC
UL52- Ext1	TTACCCGGCGCCGACTCGTC
UL52- Ext2	GCCGTCTCGGCGTGCATAA

Table S3: Primers used for HCMV-BAC recombinant viruses construction.

Mutation	Sens	5' → 3'
UL52 C200S	For	ACTGCGGCGACTGTGCGCGCCGCTGGCCATCGACACGCGCTCCAACCTATGCGCCA TCATCAGTAGGGATAACAGGGTAATCGATT
	Rev	AGTCCTGTTTGAGGCAGATGCTGATGATGGCGCATAGGTTGGAGCGCGTGTGATG GCCAGCGGCCAGTGTTACAACCAATTAACC
UL52 C203S	For	ACTGTGCGCGCCGCTGGCCATCGACACGCGCTGTAACCTATCCGCCATCATCAGCA TCTGCCTTAGGGATAACAGGGTAATCGATT
	Rev	TCTGGTCGCAGTCCTGTTTGAGGCAGATGCTGATGATGGCGGATAGGTTACAGCGC GTGTCGAGCCAGTGTTACAACCAATTAACC
UL52 C226S	For	GGACTGCGACCAGAGCTGGCTCCTCGAGTACAGCTTGCTGTCTTCAAATGCAGTTA CGCGCCTAGGGATAACAGGGTAATCGATT
	Rev	GCGTGCTGAGCGCCGCACGGGGCGCGTAAGTGCATTTGAAGGACAGCAAGCTGTAC TCGAGGAGCCAGTGTTACAACCAATTAACC
UL52 C229S	For	CCAGAGCTGGCTCCTCGAGTACAGCTTGCTGTGCTTCAAATCCAGTTACGCGCCCCG TGCGGCTAGGGATAACAGGGTAATCGATT
	Rev	TGATGATGAGCGTGCTGAGCGCCGCACGGGGCGCGTAAGTGCATTTGAAGCACAGC AAGCTGTGCCAGTGTTACAACCAATTAACC
UL52 H276A	For	GTTCCGACACCAGTTCTCACGGTCTTCGATTTCCACCTGGCCTTTTTCATCAATCGT TGCTTTAGGGATAACAGGGTAATCGATT
	Rev	CGTCGCCCACTTGTCTTCAAAGCAACGATTGATGAAAAAGGCCAGGTGGAATCGA AGACCGGCCAGTGTTACAACCAATTAACC
UL52 C282S	For	CACGGTCTTCGATTTCCACCTGCATTTTTCATCAATCGTTTCTTTGAAAAACAAGTG GGCGATAGGGATAACAGGGTAATCGA
	Rev	CATTCTCGTTATCAACCGCGTCGCCCACTTGTCTTCAAAGGAACGATTGATGAAAA GTGCAGCCAGTGTTACAACCAATTAACC
UL52 C459S	For	CGTACCCGCTTTTTTACCAAGAACCAACAGTACCGTGTCCCTGCTGTGCGAACTC ATGGCTAGGGATAACAGGGTAATCGATT

	Rev	CGTTATCGTAATAGGAGCAGGCCATGAGTTCGCACAGCAGGGACACGGTACTGGTTT GGTTCTGCCAGTGTTACAACCAATTAACC
UL52 C462S	For	TTTTTTTACCAAGAACCAAACCAGTACCGTGTGTCTGCTGTCCGAACTCATGGCCTGC TCCTATAGGGATAACAGGGTAATCGATT
	Rev	GCAGGACGACGTTATCGTAATAGGAGCAGGCCATGAGTTCGGACAGCAGACACACG GACTGGGCCAGTGTTACAACCAATTAACC
UL52 H567A	For	CCACGTCCTGCGTCAGGCAGGCGTCACGGGCATCTACAAGGCCTTTTTCTGCGACC CGCAGTGTAGGGATAACAGGGTAATCGAT
	Rev	TGACGCGGATGTTGCCGGCGCACTGCGGGTCGCAGAAAAAGGCCTTGTAGATGCC GTGACGCGCCAGTGTTACAACCAATTAACC
UL52 C570S	For	GCGTCAGGCAGGCGTCACGGGCATCTACAAGCACTTTTTCTCCGACCCGAGTGCG CCGGCAATAGGGATAACAGGGTAATCGATT
	Rev	CCTCGTTGGTGACGCGGATGTTGCCGGCGCACTGCGGGTCGGAGAAAAAGTGCTTG TAGATGCGCCAGTGTTACAACCAATTAACC
UL52 C574S	For	CGTCACGGGCATCTACAAGCACTTTTTCTGCGACCCGAGTCCGCCGGCAACATCC GCGTCACTAGGGATAACAGGGTAATCGATT
	Rev	CGAAGAGCACGGCCTCGTTGGTGACGCGGATGTTGCCGGCGGACTGCGGGTCGCA GAAAAAGTGCCAGTGTTACAACCAATTAACC



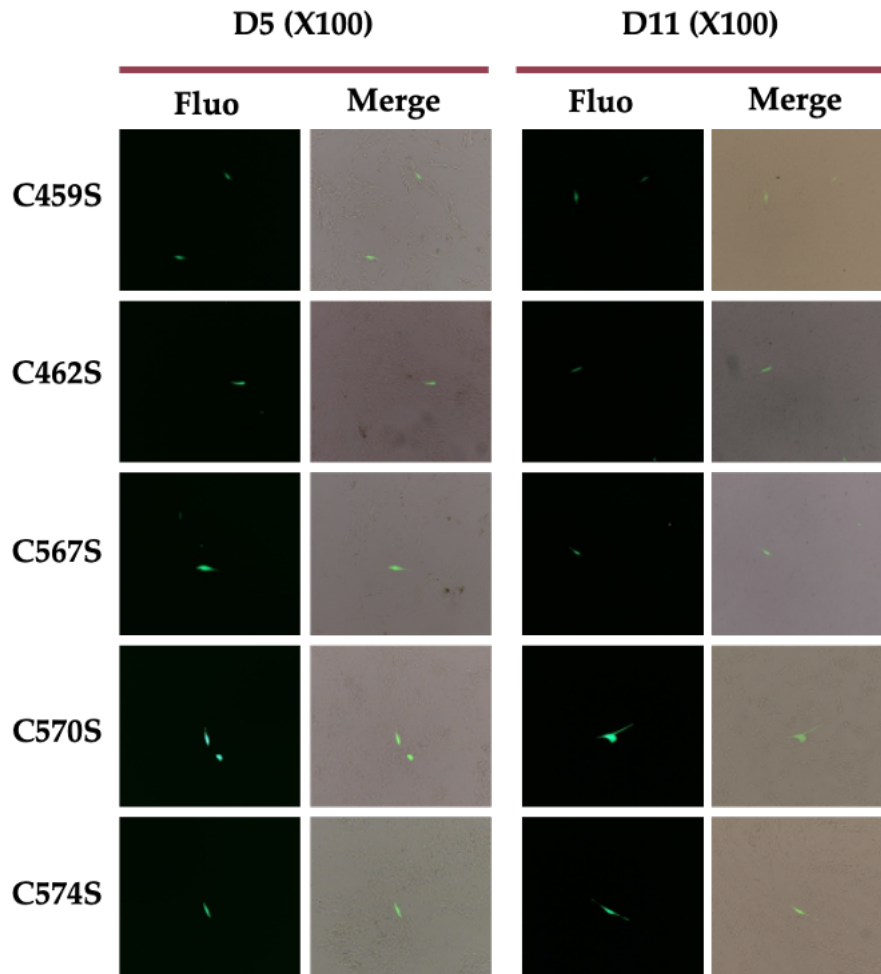


Figure S1. Plaque formation assay in MRC-5 cells after transfection of HCMV-BAC-*UL52* WT (AD169) or recombinant virus strains for the conserved region I, II and III. Green fluorescent foci were observed with the wild-type HCMV-BAC-*UL52* and single infected cells were observed with the other recombinant viruses. Eleven days after transfection of human fibroblasts, we observed no cytopathic effect for the different mutants except the recombinant strain AD169-*UL52*-C229S and AD169-*UL52*-C570S. These mutations dramatically impaired viral replication and propagation in cell-culture.

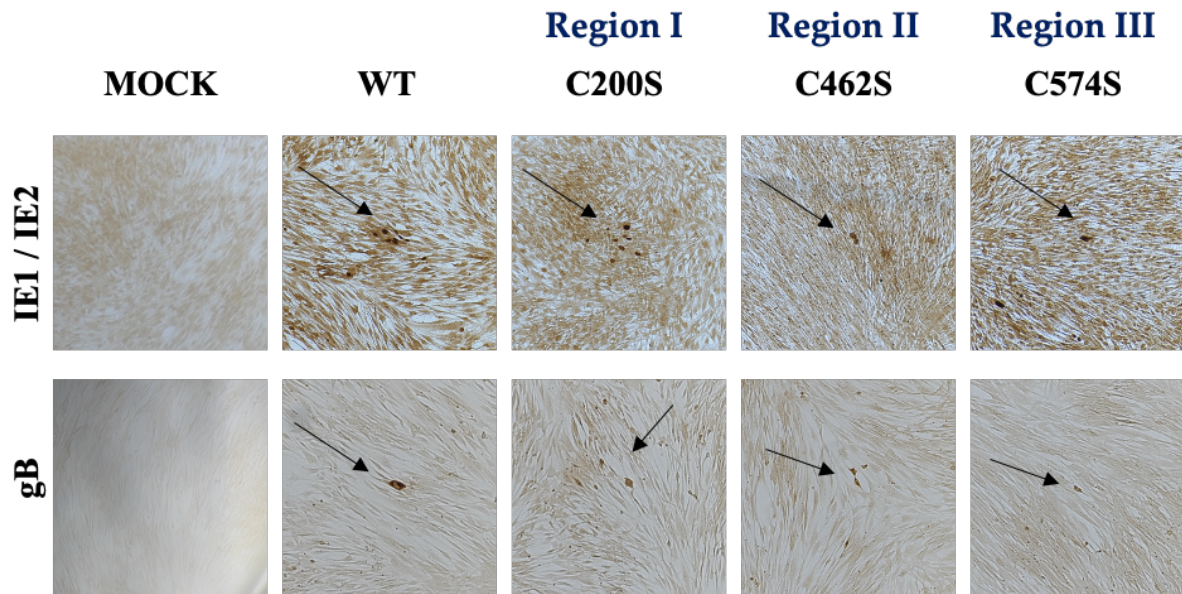


Figure S2. pUL52 is not required for viral late gene expression. MRC-5 were transfected with HCMV-BAC WT or one the mutant of each conserved region. Day 5 post-transfection, immunostaining was performed for early (IE1/IE2) and late (gB) viral proteins (black arrows). (Magnification : 100X).

Travaux complémentaires : implication de pUL52 dans le mécanisme d'action du letermovir ?

La comparaison du polymorphisme des souches cliniques naïves de tout traitement et celles issues de patients traités nous a permis d'identifier dans pUL52 les **6** substitutions suivantes : **L66F**, **G115V**, **S392P**, **E335Q**, **408del**, **H420N**. Ces substitutions ont été étudiées afin d'écartier leur implication dans une résistance au letermovir.

Ainsi 6 virus recombinants ont été générés par la méthode des BAC (Chromosome Bactérien Artificiel). Après avoir validé la présence de la mutation introduite par séquençage Sanger, l'évaluation de la capacité répliquative et de la résistance au letermovir a été effectuée. Le tableau 8 reprend le génotype et phénotype de ces 6 virus recombinants. Comme supposé dans l'article, ces mutations ne confèrent pas de résistance au letermovir. Par ailleurs, elles ne changent pas la capacité du virus à répliquer (**Figure 25**).

Tableau 8 : Concentrations efficaces inhibant 50 % de la croissance virale (EC50) pour les 6 virus recombinants.

Souche	Mutations	EC50 (nM)			
		Letermovir			
		Moyenne	Ecart-type	N ¹	Ratio ²
AD169	WT	2,462	1,000	15	1,000
AD169	UL52 L66F	2,268	0,633	3	0,921
AD169	UL52 S392P	2,527	0,368	4	1,026
AD169	UL52 G115V	1,845	0,731	5	0,749
AD169	UL52 E335Q	2,321	0,430	3	0,943
AD169	UL52 E408del	3,555	0,264	3	1,444
AD169	UL52 H420N	3,012	0,189	3	1,223

¹ Nombre de réplicats, ² Rapports des valeurs EC50 à celles de la souche témoin sauvage AD169 WT.

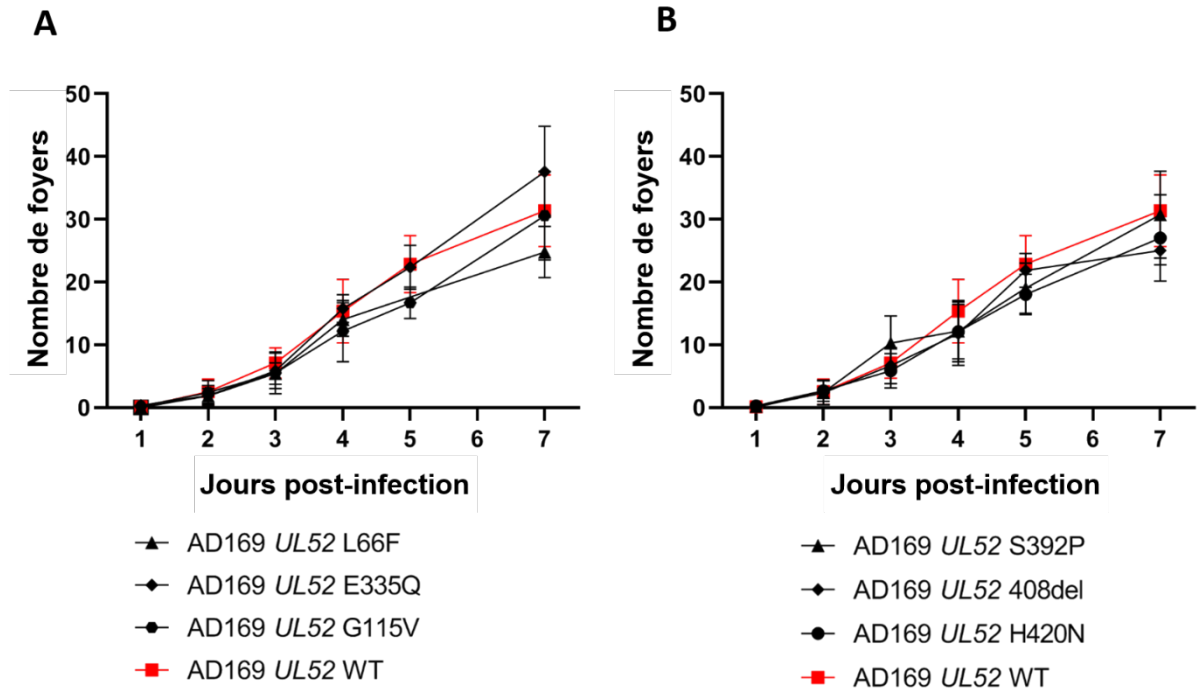


Figure 27 : Analyse des courbes de croissances des 6 virus recombinants pUL52.

A. Courbes de croissance des souches virales recombinantes AD169-UL52-L66F, AD169-UL52-G115V; AD169-UL52-E335Q en comparaison avec la souche parentale AD169-UL52-WT. **B.** Courbes de croissance des souches virales recombinantes AD169-UL52-S392P, AD169-UL52-408del; AD169-UL52-H420N en comparaison avec la souche parentale AD169-UL52-WT. Les foyers fluorescents ont été comptés quotidiennement du jour 1 au jour 7. Les courbes représentent la moyenne d'au moins trois expériences indépendantes en triplicat. Le test de Mann-Whitney a été appliqué pour l'analyse statistique et les souches recombinantes ont été comparées à la souche parentale. Aucune différence significative n'a été observée.

PARTIE 3 : Production des protéines pUL56 et pUL89

3.1. Objectifs

Les protéines du complexe d'encapsidation sont la cible du letermovir. Cependant, aucune donnée ne permet d'expliquer le fonctionnement exact de cette molécule. Les mutations de résistance se situant dans les gènes codant les protéines pUL56, pUL89 et pUL51 permettent de supposer que le letermovir interagit à ce niveau en bloquant la fonction du complexe (Cherrier et al., 2018; Chou, 2017; Chou et al., 2018; Ligat et al., 2020; Muller et al., 2022).

La résolution tridimensionnelle de la structure du complexe terminase de l'HSV-1 (PDB : 6M5R) représente une avancée majeure et nous a permis de reporter toutes les mutations de résistance au letermovir décrites dans cette structure (**Figure 28**) (Muller et al., 2022). Ces résultats suggèrent que le letermovir bloque l'interaction entre les protéines pUL51, pUL56 et pUL89 ou encore l'assemblage du complexe en hexamère (**Figure 28**).

Cette hypothèse pourrait être validée par l'utilisation de la technologie ALPHA (Perkin Elmer, USA) en présence d'une gamme de concentration de letermovir.

La technologie ALPHA, développée par Perkin Elmer, est une méthode très sensible utilisée pour étudier les interactions entre deux protéines. Le principe repose sur la proximité physique entre deux billes, une bille donneuse et une bille acceptrice qui peuvent se coupler de manière non covalente aux étiquettes hémagglutinine (HA) ou polyhistidine (6xHIS) ajoutées aux protéines d'intérêt (**Figure 29**).

L'objectif de ce travail est de **produire les protéines pUL56 et pUL89** respectivement marquées des **étiquettes HA et 6xHIS** afin de les étudier et d'effectuer des tests d'interaction en présence de letermovir ou de peptides thérapeutiques.

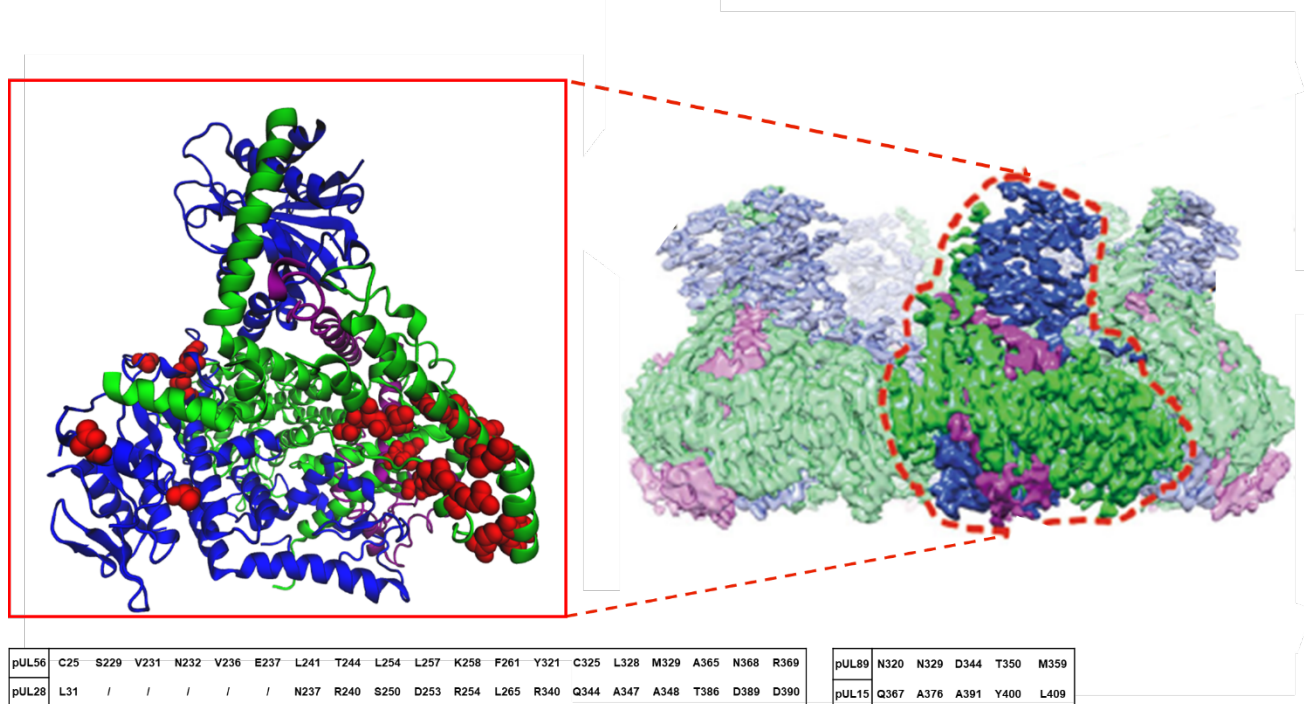


Figure 28 : Structure tridimensionnelle du complexe terminase de HSV-1 incluant les mutations de résistance au letermovir.

pUL15, pUL28 et pUL51 sont respectivement représentés bleu, vert et violet. Les résidus impliquant une résistance au letermovir dans pUL56, pUL89 sont rapportés dans pUL28 et pUL15 comme décrit dans le tableau. Les résidus impliquant une résistance au letermovir dans pUL51 sont directement rapportés dans la structure. Les mutations sont représentées rouge. Adapté de Muller et al. 2022.

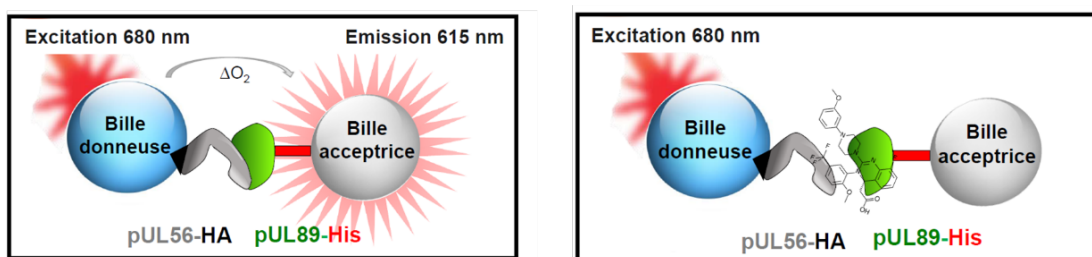


Figure 29 : Schéma d'un test d'interaction protéine-protéine avec la technologie ALPHA.

Dans un test d'interaction avec la technologie ALPHA, les protéines portant l'étiquette HA se fixent de manière non covalente à des billes donneuses. Celles portant l'étiquette 6xHIS à des billes acceptrices. En cas d'interaction, la bille donneuse est amenée à proximité de la bille acceptrice. L'excitation de la bille donneuse entraîne la génération d'un signal dépendant de la présence d'une interaction.

3.2. Production des protéines pUL89 et pUL56 : état des lieux

Une protéine recombinante est une protéine produite dans un organisme/cellule ne produisant pas cette protéine naturellement. Avec l'essor des biotechnologies le siècle dernier, différents systèmes de production de protéines recombinantes ont été développés. Les systèmes couramment utilisés comprennent ceux dérivés de bactéries, de levures, de baculovirus en cellules d'insectes et de cellules de mammifères.

Au sein de notre équipe, différents systèmes de production ont été employés pour produire les protéines pUL89 et pUL56. Les premiers essais ont été effectués dans un système procaryote (*E.coli*) avec le plasmide pGEX-6P-1 (Sigma-Aldrich, USA). Les protéines étaient produites en large quantité, mais formaient des corps d'inclusion difficiles à solubiliser (Hantz, thèse d'université, 2009) (Tableau 9). Une autre méthode a donc été envisagée ; la production en cellules de mammifères (HEK-293T ; ATCC : CRL-11268™) en transfection transitoire. Les plasmides utilisés étaient pour pUL56 un dérivé du vecteur pGEM® 3z (Promega, France) donné par le Pr Chou et pour pUL89 le vecteur pCIneo (Promega, France). Les protéines pUL56 et pUL89 étaient avec ces vecteurs respectivement marquées avec les étiquettes HA et 6xHIS en N-terminal. Les western blots et les tests d'interaction par la technologie ALPHA ont permis de valider la production protéique cependant la difficulté de reproduire ces expériences ne nous a pas permis d'utiliser ce système pour ce travail de thèse (Ligat, thèse d'université, 2017) (**Tableau 9**).

À la vue de ces difficultés rencontrées, notre choix s'est porté sur la production en cellules d'insectes avec des baculovirus recombinants. D'après les données de la littérature, cette méthode a été largement employée pour la production de protéines virales de grande taille (Savva et al., 2004; Scheffczik, 2002; Yang et al., 2020). Le **tableau 9** présente les informations relatives aux constructions envisagées pour la production des protéines pUL89 et pUL56.

Tableau 9 : Informations relatives aux protéines pUL56 et pUL89 du CMVH.

	pUL89	pUL56
Localisation cellulaire	Intracellulaire Cytoplasmique	Intracellulaire Cytoplasmique Nucléaire
Précédentes expériences	Formation corps d'inclusions en bactéries Production en trop faible quantité dans des cellules de mammifères (HEK 297T)	
Constructions envisagées		
Nombre d'acides aminés	684	896
Poids moléculaire théorique (KDa)	78,19	101,34
pHi théorique	8,56	6,03
Index de stabilité théorique	Stable	Instable
<i>Données bio-informatiques recueillies par l'utilisation de l'outil ProtParam (https://web.expasy.org/protparam/)</i>		

3.3. Expériences de production par baculovirus en cellules d'insectes

3.3.1 Les baculovirus

Les **baculovirus** sont des virus à ADN double brin infectant principalement les larves de lépidoptères. Ce sont des virus enveloppés en forme de bâtonnets, d'une longueur et d'un diamètre d'environ 350 et 50 nm avec la particularité d'exprimer, en phase tardive du cycle viral, deux protéines ; **(I)** la **protéine P10** qui forme des structures fibrillaires dans le noyau et le cytoplasme, **(II)** la **polyédrine** impliquée dans la formation de polyèdres (ou corps d'occlusion de polyédrine) nécessaires à la dissémination du virus dans le milieu extérieur. La polyédrine est une protéine non essentielle au cycle de réplication du virus en cellules d'insectes (Smith et al., 1983) et forme donc des polyèdres majoritairement nucléaires visibles au microscope optique. La séquence codante de la polyédrine se trouve sous le contrôle d'un promoteur très fort, appelé promoteur **Pe**.

Ces caractéristiques sont exploitées dans le processus de sélection des baculovirus recombinants, du fait du remplacement de la séquence codant la polyédrine virale par la séquence codant une protéine d'intérêt. Ainsi, le baculovirus recombinant aura, sous son promoteur fort **Pe**, la séquence de la protéine d'intérêt.

Ce système implique donc une recombinaison homologue dans les cellules d'insectes comme les cellules *Sf9* entre l'ADN viral extrait du baculovirus sauvage et un vecteur de transfert recombinant contenant la séquence d'intérêt. Le vecteur de transfert comporte de part et d'autre de la séquence d'intérêt des fragments de génome de baculovirus identiques aux séquences en amont et en aval du site d'insertion souhaité afin de faciliter et cibler la recombinaison homologue (**Figure 30**).

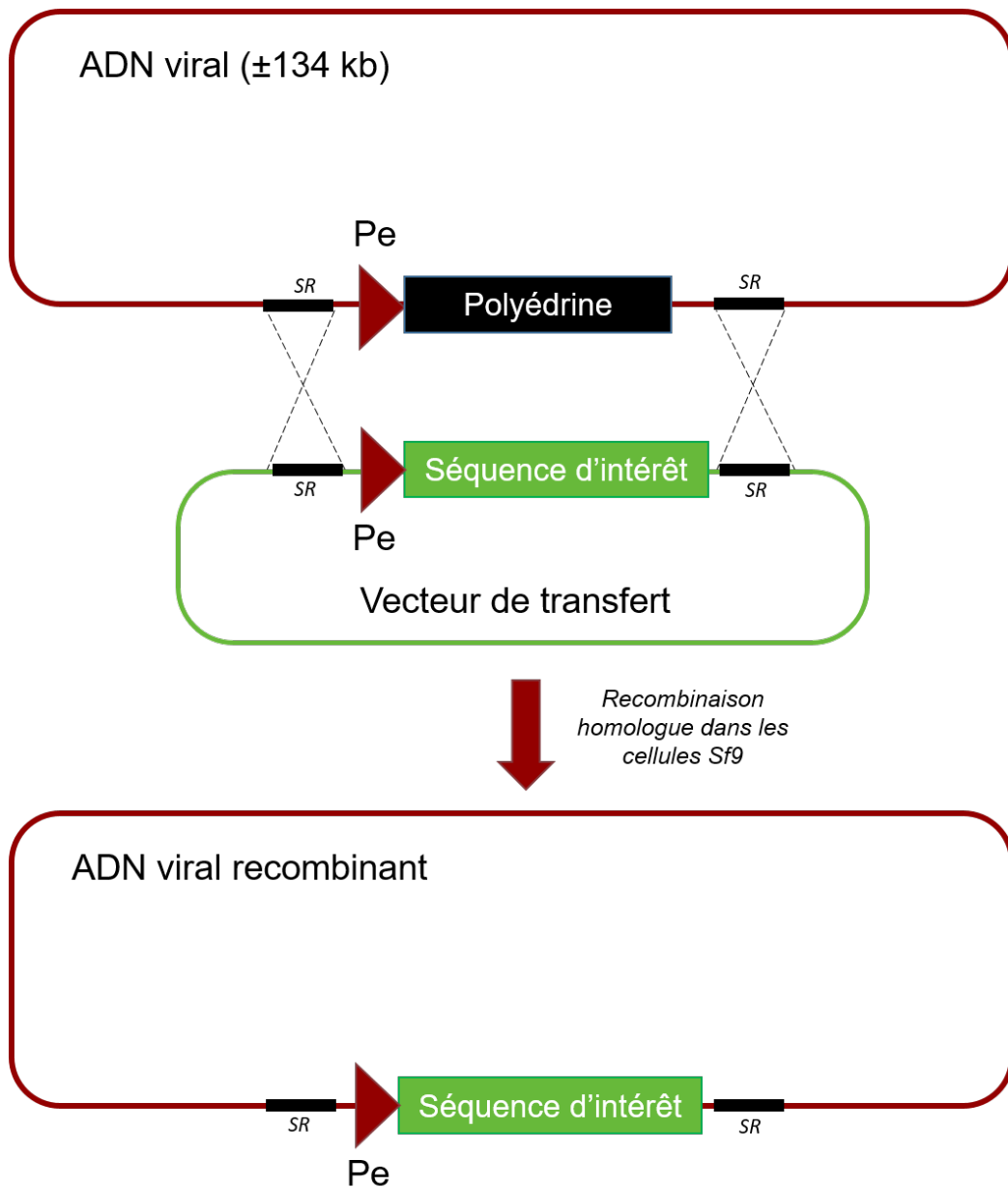


Figure 30 : Représentation schématique de l'obtention d'un virus recombinant par recombinaison homologue.

Pe : promoteur *Pe*, *SR* : séquences de recombinaison.

Le baculovirus le plus couramment utilisé pour l'expression de protéines recombinantes est **AcMNPV** ou *Autographa californica* multiple nucleopolyhedrovirus (Jarvis, 2009; Pennock et al., 1984). Des remaniements du génome viral ont permis d'obtenir le virus modifié **AcSLP10**, pour lequel le promoteur **Pe** est remplacé par le promoteur fort **P10**. Dans ce virus, la synthèse de la polyédrine dépend alors du promoteur **P10** (Chaabihi et al., 1993).

Ce système d'expression présente plusieurs avantages par rapport aux systèmes d'expression bactériens et mammifères. Il se démarque notamment par son **haut potentiel de production** de protéines recombinantes avec un rendement variant de quelques milligrammes à une centaine de milligrammes par litre de culture selon la protéine étudiée (Jarvis, 2009). Par ailleurs, contrairement aux systèmes d'expression bactériens, la production est **rarement associée à la formation de corps d'inclusion**. Ce système possède également l'avantage de pouvoir accueillir de **grandes séquences codantes** et d'effectuer la plupart des **modifications post-traductionnelles** comme la glycosylation qui toutefois est moins élaborée que dans les systèmes d'expression mammaliens (Summers, 1987). Il convient également d'ajouter que ce système s'avère efficace pour la **production de complexe multiprotéique** (Berger et al., 2004). Enfin, les coûts d'entretien et de production sont relativement faibles (plus onéreux que les systèmes d'expression bactériens, mais moins par rapport aux systèmes d'expression en cellules de mammifères).

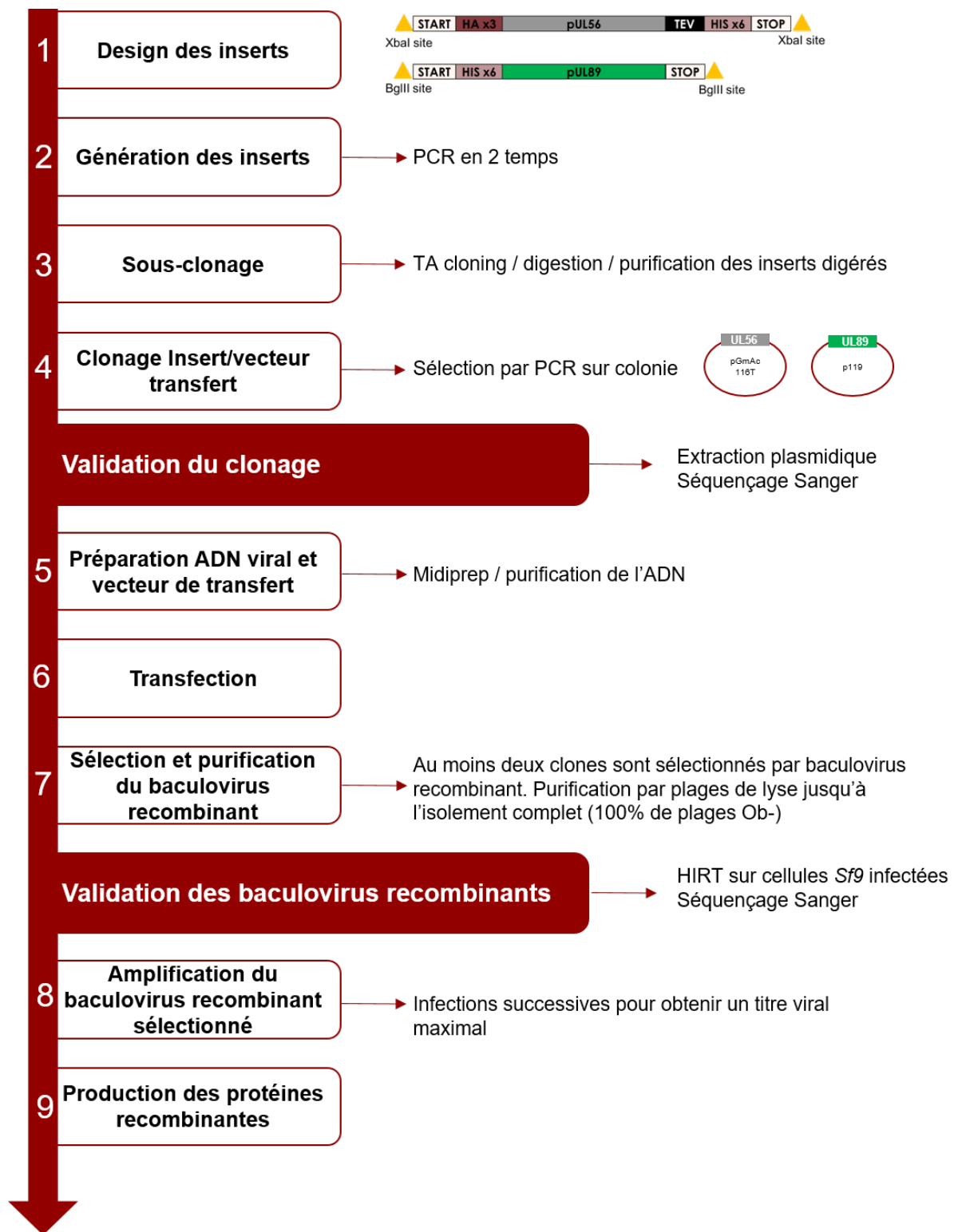


Figure 31 : Organigramme, du design des inserts à la construction des baculovirus recombinants, pour la production de protéines pUL56 et pUL89.

3.4. Matériels et méthodes

3.4.1 Cellules et infection

Le sous-clone *Sf9* des cellules *Sf21* de *Spodoptera frugiperda* (Vaughn et al., 1977) est maintenu à 28 °C dans un milieu de croissance TC-100 supplémenté par 5 % de sérum de veaux foetal décomplémenté, 50 U.mL⁻¹ de pénicilline et 50 µg. mL⁻¹ de streptomycine. Les cellules adhérentes sontensemencées entre 100 000 et 120 000 cellules par cm² tous les deux à trois jours pour leur maintien dans des flacons de 25 cm². Elles sont infectées ou co-infectées par du baculovirus (sauvage ou recombinant), dont le titre viral est maximal (1.10⁷ à 1.10⁸ particules virales par mL en moyenne) avec un inoculum correspondant à 10 % du volume de total de travail. Après 45 minutes d'incubation à 28 °C avec les suspensions virales, du milieu de culture est ajouté et les cellules sont incubées à 28 °C jusqu'à récupération (3 à 6 jours après selon les cas).

3.4.2 Constructions plasmidiques

Génération des inserts par PCR et sous-clonage

Les inserts UL56 et UL89 représentés dans la première ligne de l'organigramme (**Figure 31**) sont générés par deux étapes de PCR avec les amorces présentées dans l'**annexe 5, tableau 1**. La matrice d'ADN utilisée pour la première PCR est celle des plasmides pCIneo [UL89-N-HIS] et SC784 [UL56-N-HA] préalablement décrits (Ligat et al., 2017). Les produits obtenus sont déposés sur gel d'agarose (0,8 %), purifiés (PCR clean up system, Promega, France) puis réamplifiés avec la seconde paire d'amorces permettant d'introduire les séquences souhaitées. Les produits obtenus sont déposés sur gel d'agarose (0,8 %), purifiés (PCR clean up system, Promega, France) puis introduits par *TA cloning* dans le plasmide pGEM-T easy (#A1360, Promega, France) suivant le protocole du fournisseur en utilisant la polymérase Extaq® (#RR001, TaKaRa, Japon). La transformation bactérienne du mélange de ligature est réalisée selon les instructions du protocole PT5055-2 Stellar™ *competent cell* (Clontech, Japon). Les colonies se développant sur gélose LB amp+ correspondent aux bactéries transformées ayant intégrées la construction plasmidique possédant le gène de résistance à l'ampicilline.

Des digestions par les enzymes de restriction *Xba I* ou *Bgl II* sont effectuées à partir des extractions plasmidiques effectuées sur les colonies recombinantes (NucleoSpin Plasmid Mini, Macherey Nagel, Allemagne). Les digestions des plasmides pGEMT [UL56] et pGEMT

[UL89] sont analysées après migration sur gel d'agarose 0,8 %. Les inserts UL56 et UL89 libérés par digestion sont purifiés sur gel (PCR and gel clean up system, Promega, France).

Clonages des inserts dans les vecteurs de transfert

Les inserts UL89 et UL56, préalablement digérés et purifiés, sont respectivement insérés en aval du promoteur **P10** ou **Pe**, comportant entre autres un site unique *Bgl II* ou *Xba I* selon le vecteur de transfert baculovirus choisi p119 (Chaabihi et al., 1993) ou pGmAc116T (Poul et al., 1995). La transformation bactérienne est réalisée selon les instructions du protocole PT5055-2 Stellar™ competent cell (Clontech, Japon). Les plasmides recombinants sont sélectionnés par PCR de criblage avec les couples d'amorces UL56-3F/UL56-6R et UL89-3F/UL89-6R (Annexe 5, tableau 2). L'orientation de l'insert dans la construction plasmidique est validée par séquençage Sanger. Les amorces utilisées pour le séquençage Sanger sont présentées dans le **tableau 2 de l'annexe 5**.

Préparation du vecteur de transfert pour la transfection

Après avoir validé les constructions pGmAc116T [UL56] et p119 [UL89] par séquençage, des extractions plasmidiques sont effectuées avec le kit NucleoBond Xtra Midi (Macherey Nagel, Allemagne). L'ADN plasmidique ainsi purifié est ensuite concentré par précipitation à l'éthanol et repris stérilement à une concentration de $1 \mu\text{g} \cdot \mu\text{L}^{-1}$ dans du tampon TE 1X (Tris - HCl 10 mM, EDTA 1 mM, pH 8).

3.4.3 Obtention des baculovirus recombinants AcMNPV [UL56] et AcSLP10 [UL89]

Les cellules *Sf9* sont co-transfectées avec 5 μg de vecteur de transfert recombinant et 1 μg d'ADN viral purifié à l'aide d'une méthode de lipofection (Transfast®, Promega, France). Deux préparations d'ADN viral distinctes sont utilisées : **(I)** l'ADN viral extrait du virus de type sauvage *Autographa californica multiple nucleopolyhedrovirus* (**AcMNPV**), lorsqu'un vecteur de transfert spécifique de la polyédrine (**pGmAc116T**) est utilisé et, **(II)** l'ADN viral extrait du baculovirus **AcSLP10** (Chaabihi et al., 1993) pour lequel l'expression du gène de la polyédrine a été mise sous la dépendance du promoteur tardif P10 lorsque le vecteur de transfert spécifique de **P10** (**p119**) est utilisé. Dans chaque cas, les baculovirus recombinants sont sélectionnés par la technique classique des plages de lyse et distingués de la descendance de type sauvage par leur phénotype négatif **Ob -**, c'est-à-dire par l'absence de polyèdres dans le noyau des cellules infectées dans une plage de lyse donnée (**Figure 32**). Le criblage et la

purification des baculovirus recombinants ont été effectués par la technique des plages de lyse comme décrite précédemment (Summers, 1987). Afin de s'assurer d'une recombinaison effective et de la présence des inserts, l'extraction des ADNs est effectuée par la méthode de Hirt (Hirt, 1967).

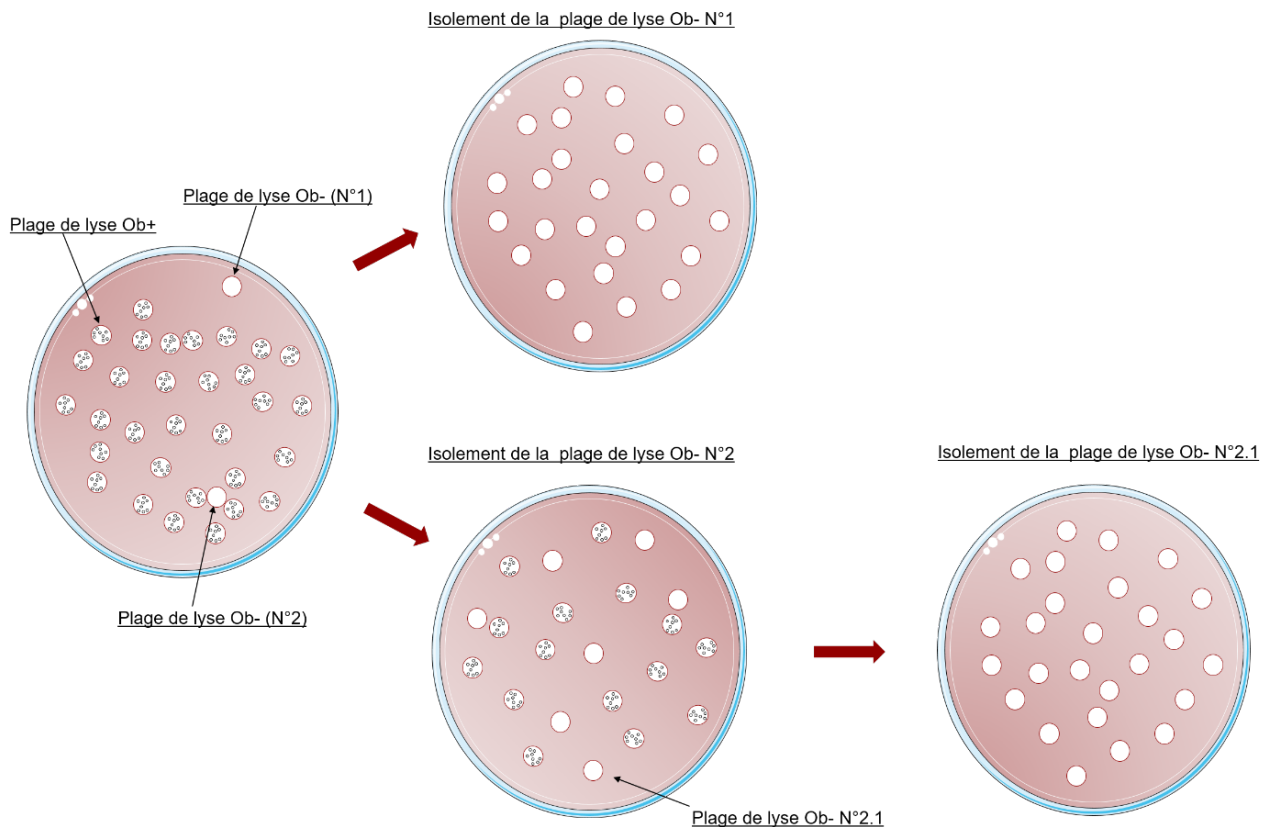


Figure 32 : Isolement d'un baculovirus recombinant par la méthode des plages de lyse. Les plages de lyse Ob+ et Ob- se caractérisent par des plages de cellules infectées avec ou sans polyèdres. Elles sont respectivement présentées par des cercles blancs avec ou sans points dedans. Les plages de lyses Ob- sont prélevées par carottage et purifiées par la même méthode jusqu'à l'obtention d'un baculovirus recombinant pur. Le prélèvement d'une plage de lyse Ob- bien isolée permet d'obtenir le baculovirus recombinant pur plus rapidement.

3.4.4 Lyse cellulaire et purification des protéines pUL56 ou pUL89

Des cellules d'insecte *Sf9* sontensemencées dans des flacons de 75 cm² et infectées avec des *inoculi* de baculovirus recombinants. Les cellules sont récupérées 3 jours après l'infection et centrifugées à 100 g pendant 5 minutes avant d'être lavées par 10 mL de tampon PBS puis de nouveau centrifugées. Deux méthodes de lyses sont utilisées avant d'effectuer une purification de pseudo-affinité sur billes d'agarose Ni-NTA (#36113, Qiagen, Allemagne). La première est la lyse par cycle de congélation/décongélation, la seconde est la lyse par désintégration ultrasonore en utilisant le tampon A recommandé pour la purification (50mM NaH₂PO₄, 300mM NaCl, 10 mM Imidazole, pH 8). Le pHi théorique des protéines recombinantes pUL56 et pUL89 est respectivement de 6,03 et 8,56 (Tableau 9). Brièvement, les culots sont repris dans 500 µL de tampon A puis laissé 30 minutes à 4 °C sur roue. Ils sont ensuite soit (I) congelés/décongelés 5 fois ou (II) soniqués 5 fois de suite à une amplitude de 10 % en utilisant des pulses de 5 secondes espacés de 10 secondes. Les échantillons sont ensuite centrifugés pendant 30 minutes à 4 °C à 21 000 g (Centrifuge 5424 R, Eppendorf®, Allemagne). Les lysats sont mis en contact avec les billes magnétiques Ni-NTA agarose (#36113, Qiagen, Allemagne), préalablement équilibrées dans le tampon A, et sont laissés une nuit à 4 °C en agitation rotative. Deux lavages sont effectués avec le tampon B (50mM NaH₂PO₄, 300mM NaCl, 20 mM Imidazole, 0,005% Tween 20, pH 8) suivi de 3 éluions dans 30 µL à l'aide du tampon C (50 mM NaH₂PO₄, 300 mM NaCl, 250 mM Imidazole, 0,005% Tween 20, pH 8). L'annexe 6 détaille la composition des tampons et le protocole de purification.

3.4.5 Méthodes d'analyse et de détection des protéines

SDS-PAGE et Western blot

Les échantillons à étudier sont dilués dans un tampon de charge 5X selon Laemmli (Laemmli, 1970) en conditions dénaturantes et réductrices (Annexe 7). Ils sont chauffés à 95 °C et déposés en gel d'électrophorèse à 12 % de polyacrylamide (SDS-PAGE). Après séparation, les protéines sont (I) mises en évidence par coloration du gel avec une solution de bleu de Coomassie ou (II) transférées sur des membranes en polyfluorure de vinylidène (PVDF) par l'utilisation du kit Trans-Blot® Turbo RTA (BioRad, USA). Le programme de transfert (1,3 A, 25V pendant 10 minutes) est utilisé pour 1 mini gel turbo® avec l'appareil Trans-Blot® Turbo™ (BioRad, USA). La membrane est saturée 1 h à température ambiante avec une solution commerciale « Blocker™ Casein » (#37532, Thermofisher Scientific, USA) puis incubée à 4 °C sous agitation douce 16 h à 18 h en présence de l'anticorps primaire anti-

HIS (#MA1-21315, ThermoFisher Scientific, USA), dilué au 1:2500 dans la solution de saturation. Après 3 lavages successifs de 15 minutes avec du TBS-Tween 0,05 %, l'anticorps secondaire anti-IgG de souris couplé à la peroxydase (#A28177, Thermofisher Scientific, USA) est dilué au 1:2500 dans la solution de saturation et, est incubé 1 h à température ambiante sous agitation douce. Après 3 lavages successifs de 15 minutes avec la solution de TBS-Tween 0,05 %, le substrat chimioluminescent commercial « HRP Immobilon Western » (Merck Millipore, USA) est ajouté suivant les recommandations du fournisseur. Les signaux sont visualisés à l'aide de l'imageur ChemiDoc (BioRad, USA). Les compositions des solutions sont présentées en Annexe 7.

Spectrométrie de masse

La spectrométrie de masse est une technique analytique sensible utilisée dans notre cas pour confirmer la présence des protéines pUL56 et pUL89. Cette technique a été réalisée par la plateforme BISCEM de l'université de Limoges. Trois grandes étapes sont à distinguer ; **(I)** la digestion des échantillons à partir d'un gel SDS-PAGE **(II)** l'analyse par spectrométrie de masse **(III)** la recherche dans les bases de données.

À partir des gels SDS-PAGE colorés au bleu de Coomassie, les bandes d'intérêts sont excisées puis découpées en petits cubes afin d'exercer une digestion in-gel suivant le protocole adapté de Promega (<https://france.promega.com/resources/guides/protein-analysis/protease-digestion-for-mass-spec/>). Brièvement, après décoloration des bandes excisées-découpées, les protéines ont été réduites avec du DTT (5 mM) pendant 30 minutes à 56 °C et alkylées avec de l'iodoacetamide (10 mM) pendant 30 minutes dans l'obscurité. La digestion a été réalisée avec 500 ng de trypsine (#V5280, Promega, France) à 37 °C pendant un minimum de 16 heures. Les peptides ont été extraits deux fois avec 50 µL d'ACN 50 % TFA 5 %, évaporés, solubilisés dans 40 µL de solvant de charge (eau/ACN/TFA 98/2/0,05 (v/v) et finalement filtrés sur une colonne de spin de 0,22 µm (Agilent Technologies, USA).

Les peptides obtenus ont été analysés par microLC-MS/MS à l'aide d'un système nanoLC 425 en mode micro-flow (Eksigent, Irlande) couplé à un TripleTOF 5600+ (Sciex, USA) fonctionnant en mode positif. La chromatographie liquide en phase inverse a été réalisée via une configuration « *trap and elute* » en utilisant une colonne de concentration (cartouche C18 Pepmap100, 300 µm Id x 5 mm, 5 µm ; Thermo Scientific, USA) et une colonne analytique (colonne ChromXP C18, 150 x 0,3 mm i.d., 120 Å, 3 µm ; Sciex) avec les phases mobiles suivantes : solvant A (0,1 % (v/v) de FA dans l'eau) et solvant B (eau/ACN/TFA

5/95/0,1% (v/v)). Tous les échantillons ont été chargés, concentrés et dessalés en utilisant un débit de 10 $\mu\text{L}/\text{min}$ avec la phase mobile (ACN 2 %, TFA 0,05 %) pendant 5 minutes. La séparation chromatographique a été réalisée à un débit de 3 $\mu\text{L}/\text{min}$ avec le cycle suivant : conditions initiales 5 % du solvant B en augmentation jusqu'à 25 % en 43 minutes puis 95 % en 3 minutes et maintenu pendant 7 minutes et enfin diminué à 5 % pour entamer le cycle suivant. 5 μL de chaque échantillon ont été soumis à une acquisition traditionnelle dite *data-dependent acquisition* (DDA) : Les données MS et MS/MS ont été enregistrées en continu avec jusqu'à 40 composés fragmentés sélectionnés à partir de chaque balayage MS. La sélection des composés fragmentés était basée sur l'intensité de l'ion et sur le fait qu'il avait ou non été précédemment sélectionné (exclusion dynamique). Les ions ont été fragmentés en utilisant l'énergie de collision roulante.

Tous les fichiers du spectromètre de masse DDA ont été analysés par le logiciel Protein Pilot (version 5.0, Sciex) pour effectuer une recherche dans la base de données UniProt CMV (version 2021_03) via le logiciel Mascot (version 2.2, Matrix Science, UK) avec les critères suivants : tolérance de 0,01 et 0,05 Da respectivement pour les masses du précurseur et du fragment, un seul site de clivage manqué autorisé pendant la digestion à la trypsine, et carbamidométhylation des résidus cystéine (due à l'alkylation des groupes -SH par l'iodoacétamide) comme modification fixe et oxydation de la méthionine comme modification variable. L'identification des protéines a été validée manuellement.

3.5 Résultats

3.5.1. Amplification des inserts et sous-clonage

Génération des inserts : Les figures 33, A et B représentent les migrations des PCR-1 et -2 pour la génération des inserts UL56 et UL89 présentés dans l'organigramme (**Figure 31**). Bien que des bandes non spécifiques soient observées pour la PCR-1, l'amplification des inserts est validée. Concernant la PCR-2, une bande spécifique est observée aux tailles attendues de 2711 et 2075 pb pour les inserts UL56 et UL89. Ces produits de PCR-2 sont purifiés.

Validation du sous-clonage : Les figures 31, C et D représentent les migrations des produits de digestion par *Bgl* II ou *Xba* I des extractions plasmidiques, réalisées sur différents clones pGEMT [UL89] ou pGEMT [UL56] potentiellement recombinants. La présence d'une bande à la taille de l'insert valide l'obtention de la construction.

Une purification sur gel des inserts libérés par digestion a été réalisée pour effectuer leur clonage dans les vecteurs de transfert baculovirus **pGmAc116T** et **p119**.

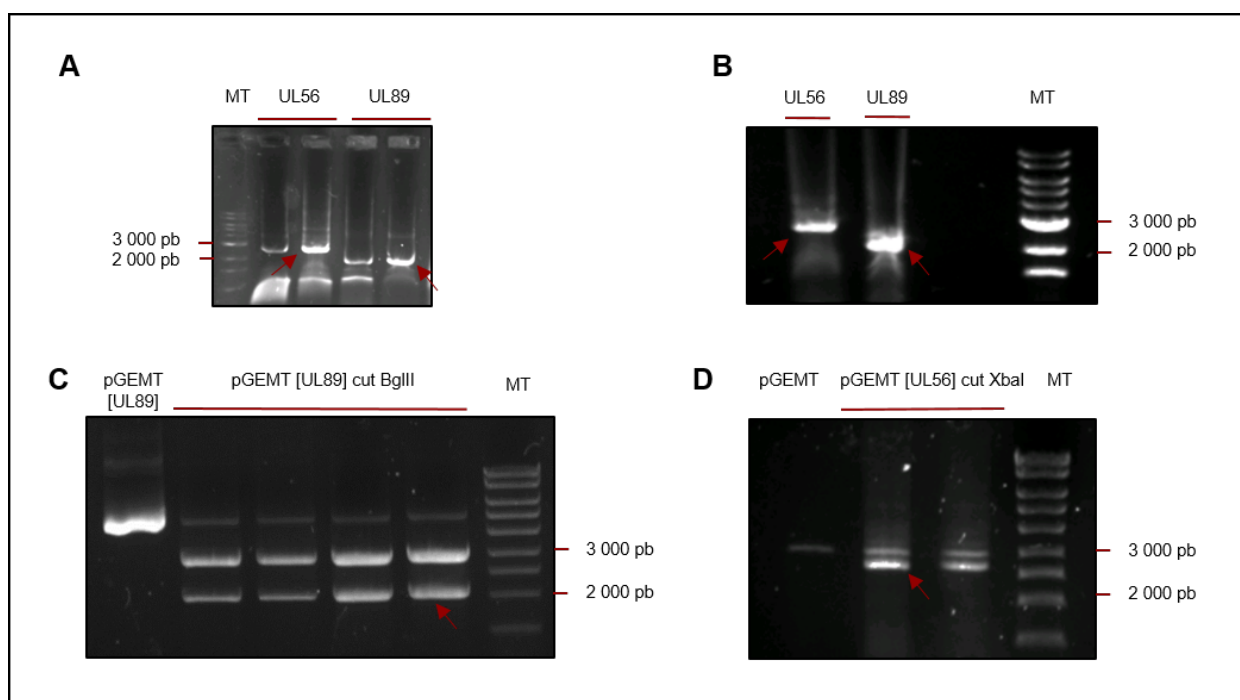


Figure 33 : Amplification des inserts UL56 et UL89 et validation du sous-clonage.

A. Migration de l'amplification des inserts UL56 et UL89 à partir des matrices SC784 [UL56] et PCIneo [UL89], PCR-1. **B.** Migration de la deuxième amplification (PCR-2) à partir de la PCR-1. **C.** Migration du plasmide pGEMT [UL89] digéré par *Bgl* II ou non. **D.** Migration des plasmides pGEMT et pGEMT [UL56] digérés par *Xba* I. Les migrations sont effectuées sur un gel d'agarose 0,8 %. Le marqueur de taille utilisé (MT) est le Smartladder (Eurogentec, Belgique).

3.5.2. Validation des vecteurs de transferts recombinants pGmAc116t [UL56] et p119 [UL89]

Validation par PCR de criblage sur colonie : La figure 34 (A et B) reporte les migrations des produits de PCR de criblage pour la validation de la présence de l'insert UL56 ou UL89 dans les vecteurs pGmAc116T et p119 respectivement.

Les colonies possédant un plasmide à partir duquel une amplification d'UL89 ou UL56 à **1 157** et **1 406 pb** est obtenue avec les couples d'amorces UL89-3F/UL89-6R et UL56-3R/UL56-6R sont sélectionnées. La bonne orientation des inserts dans les vecteurs de transfert sera ensuite vérifiée par séquençage de l'ADN plasmidique extrait de ces bactéries positives.

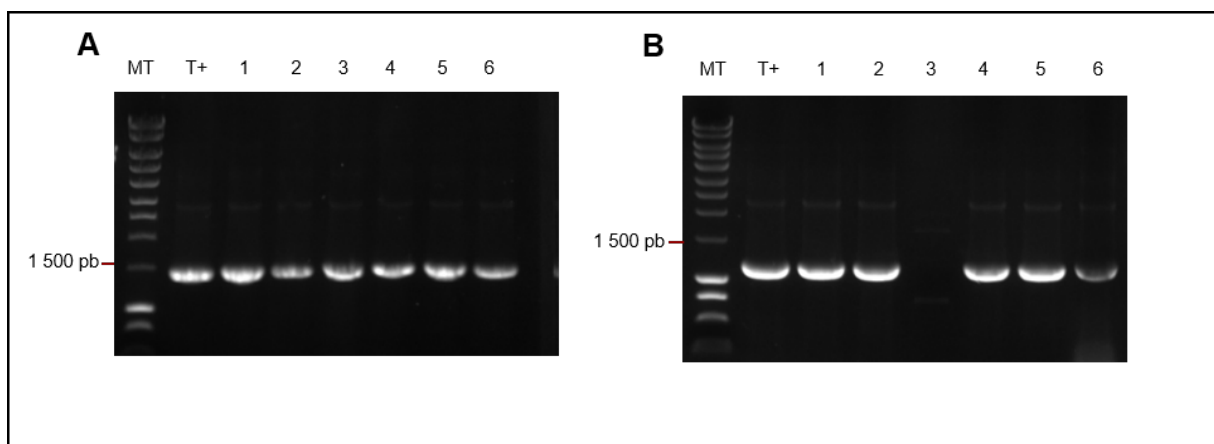


Figure 34 : Amplification des inserts UL56 et UL89 par PCR de criblage sur colonie.

A. Amplification insert UL56 des colonies transformées avec pGmAc116T [UL56]. **B.** Amplification insert UL89 des colonies transformées avec p119 [UL89]. Les migrations sont effectuées sur un gel d'agarose 0,8 %. Le marqueur de taille utilisé (MT) est le Smartladder (Eurogentec, Belgique). T+ amplification à partir des plasmides pGEMT [UL56] et pGEMT [UL89]. Les produits attendus pour les amplifications sont 1 406 pb pour UL56 et 1 157 pb pour UL89.

Validation de l'orientation de l'insert par séquençage Sanger : Dans la mesure où le clonage est effectué au niveau d'un site unique de restriction, la bonne orientation de l'insert est à vérifier avant de générer les baculovirus recombinants nécessaires à la production des protéines d'intérêt dans les cellules d'insectes. Ainsi, le séquençage des constructions plasmidiques a permis de sélectionner les vecteurs de transfert recombinants ayant intégré l'insert dans la bonne orientation. Les séquences obtenues (couvrant l'insert et les zones flanquantes du vecteurs) sont alignées avec les constructions théoriques. Les résultats pour les constructions plasmidiques **pGmAc116T [UL56]** et **p119 [UL89]** valident l'absence de mutation.

3.5.3. Obtention des baculovirus recombinants

Sélection, purification et amplification des baculovirus recombinants nommés AcMNPV [UL56] et AcSLP10 [UL89] : Suite à la transfection de l'ADN viral sauvage (**AcMNPV**) ou modifié (**AcSLP10**) avec le vecteur de transfert recombinant approprié dans les cellules d'insectes *Sf9*, une recombinaison homologue s'effectue. Pour identifier les baculovirus recombinants potentiellement générés par la recombinaison (en général : 1 % de recombinaison), la technique classique des plages de lyse repose sur l'observation des plages infectieuses au microscope optique. Alors que les baculovirus « sauvages » génèrent des polyèdres ou **corps d'occlusion** de polyédrine dans le noyau des cellules infectées (plage **Ob+**), les baculovirus recombinants n'en possèdent plus la faculté. Les plages de lyse qu'ils produisent sont nommées **Ob -**, du fait de l'absence de polyèdres (**Figure 35**). Les plages identifiées avec un phénotype **Ob -** sont prélevées par carottage pour réaliser une suspension virale. Plusieurs étapes successives de purification par cette même technique de plage de lyse sont réalisées jusqu'à obtention de 100 % de plages **Ob -**. Le baculovirus recombinant est alors considéré comme étant pur et peut être amplifié par infections successives des cellules d'insectes *Sf9*.

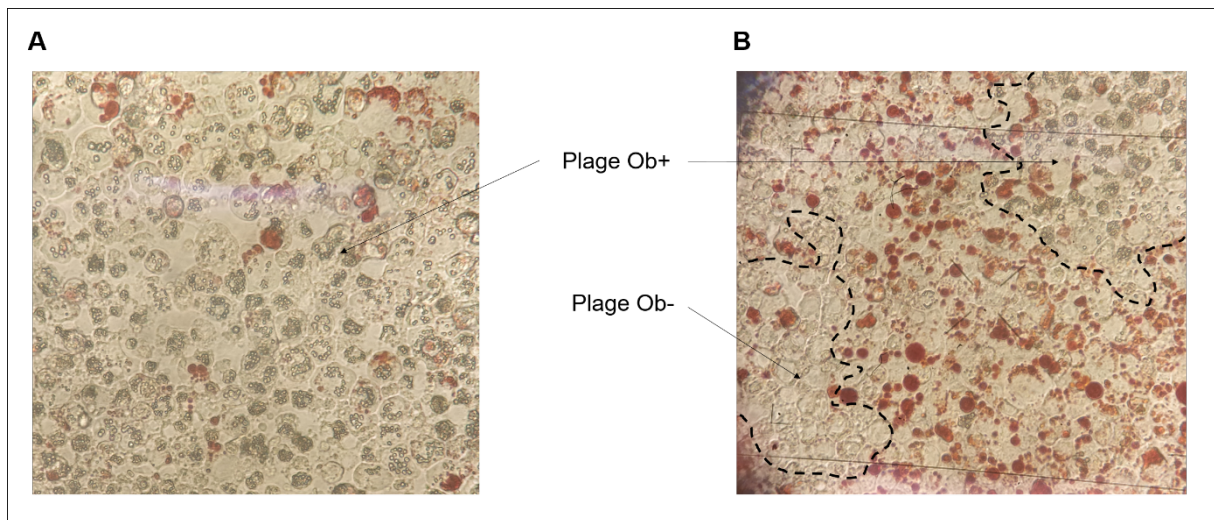


Figure 35 : Observation microscopique des plages de lyses après transfection.

Deux types de plages de lyse se distinguent ; les plages **Ob+** pour lesquelles les corps d'occlusion formés par la polyédrine (ou polyèdres) sont visibles et les plages **Ob-** (sans polyèdres) qui résultent de cellules infectées par le baculovirus recombinant. Une coloration au rouge neutre (colore les cellules vivantes en rouge) est effectuée afin de visualiser ces plages (apparaissant en blanc par exclusion du colorant). **A.** est représentatif d'une plaque de lyse **Ob+**. **B.** comporte une plaque de lyse **Ob-** qui sera prélevée malgré sa proximité avec une plaque **Ob+**. A partir de la suspension virale obtenue, le baculovirus sera purifié par la technique des plages de lyse (répétée *n* fois jusqu'à obtention de 100 % de plages **Ob-**). Grossissement : X100.

Validation de l'obtention des baculovirus recombinants AcMNPV [UL56] et AcSLP10 [UL89]

[UL89] : La **figure 36** présente les migrations des amplifications des produits PCR des inserts UL56 et UL89 à partir des extractions d'ADN effectuées avec la méthode de Hirt sur des cellules respectivement infectées par les baculovirus AcMNPV [UL56] et AcSLP10 [8L89]. Les baculovirus isolés ont correctement inséré les séquences codantes souhaitées (PCR + Séquençage). De plus, les résultats de séquençage attestent de l'absence de mutation dans la partie amplifiée.

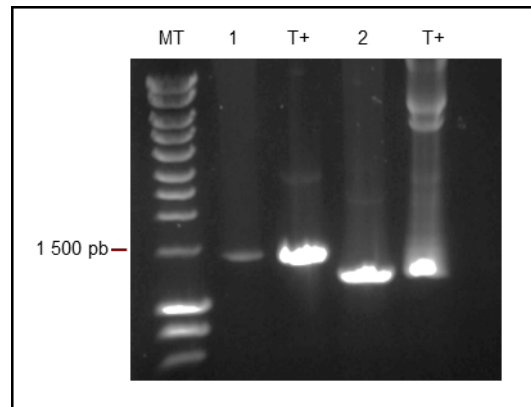


Figure 36 : Validation de l'obtention des baculovirus recombinants par PCR sur Hirt.

1 : Amplification insert UL56 à partir du Hirt AcMNPV [UL56]

2 : Amplification insert UL89 à partir du Hirt AcSLP10 [UL89]

T+ : Témoin positif. Ils sont réalisés à partir d'un Hirt d'AD169 pour UL56 et du plasmide pGEMT [UL89] pour UL89. Les migrations sont effectuées sur un gel d'agarose 0,8 %. Le marqueur de taille utilisé (MT) est le Smartladder (Eurogentec, Belgique). Les produits obtenus pour les amplifications migrent bien aux tailles attendues : 1400 pb pour UL56 et 1100 pb pour UL89.

3.5.4. Production et purification de la protéine recombinante pUL89

La production de pUL89 recombinante est validée par western blot et par spectrométrie de masse : Le profil de migration électrophorétique, après coloration du gel de polyacrylamide au bleu de Coomassie (**Figure 37, A**), ne montre pas de bande protéique plus intense à la taille attendue pour pUL89 (± 78 kDa) dans l'extrait protéique des cellules infectées par le baculovirus recombinant, ce qui aurait pu attester de la surproduction de la protéine recombinante. Par ailleurs, le profil de migration pour les cellules *Sf9* non infectées ressemble à celui normalement obtenu pour du surnageant de culture, avec une bande très caractéristique de l'albumine à environ 66 kDa (probablement une erreur expérimentale). Le western blot effectué avec l'anticorps anti-HIS sur les mêmes échantillons permet de visualiser un faible signal à environ 72 kDa pouvant correspondre à la protéine d'intérêt (**Figure 37, B**). L'extraction par excision des bandes encadrées en rouge sur le gel Coomassie (correspondant à la bande observée par western blot) a été réalisée afin d'en analyser la composition protéique par spectrométrie de masse. Les résultats de ces analyses valident la présence de pUL89 dans le lysat des cellules infectées par le baculovirus recombinant AcSLP10 [UL89] avec une couverture de 70,8 % (**Figure 37, C**). **La protéine pUL89 est donc bien produite dans l'extrait cellulaire des cellules *Sf9* infectées par le baculovirus recombinant AcSLP10 [UL89].**

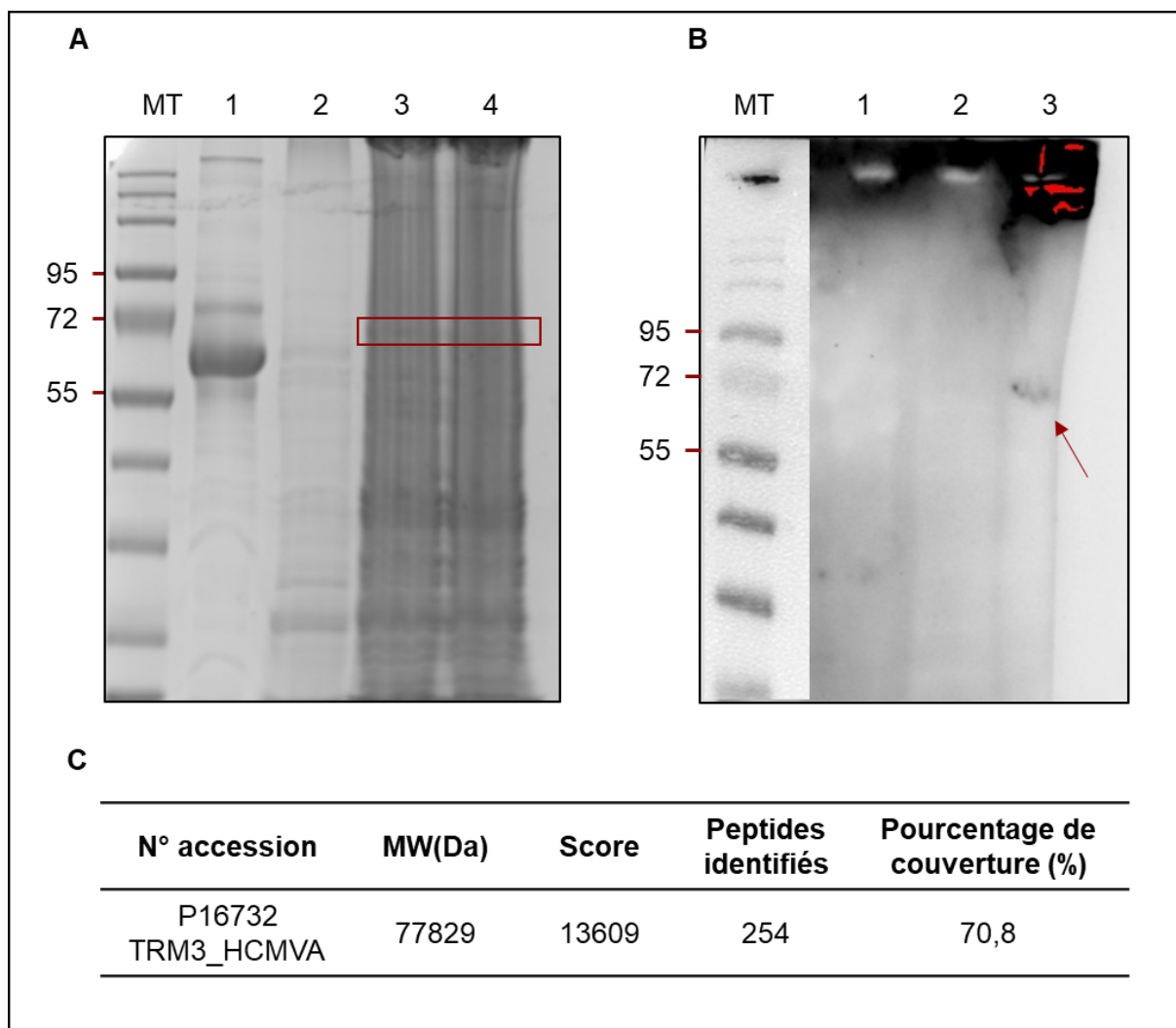


Figure 37 : Validation de la présence de pUL89 dans le lysat de cellules Sf9 infectées. Migration électrophorétique des lysats de cellules non infectées ou infectées par le baculovirus sauvage ou par le baculovirus recombinant AcSLP10 [pUL89]. Après migration, le gel est soit **A.** coloré au bleu de Coomassie soit **B.** transféré pour réaliser un western blot. MT : marqueur de taille (NEB #P7719). Piste 1 : Lysat de cellules Sf9 non infectées. Piste 2 : Lysat des cellules Sf9 infectées par le baculovirus sauvage. Piste 3 et 4 : Lysats des cellules Sf9 infectées par le baculovirus recombinant AcSLP10 [pUL89]. **C.** Tableau des résultats de l'analyse en spectrométrie de masse pour la production de pUL89 dans le lysat cellulaire de cellules infectées par AcSLP10 [UL89].

Purification de la protéine pUL89 recombinante : Deux protocoles de lyse ont été utilisés pour la purification par billes magnétiques Ni-NTA de la protéine pUL89, la première est une lyse par des cycles répétés congélations/décongélations, la seconde est par sonication. L'objectif est de trouver les conditions expérimentales permettant d'obtenir une quantité suffisante de protéine pUL89 sous forme soluble afin de la purifier dans des conditions non dénaturantes. Afin de pouvoir comparer les deux méthodes, celles-ci sont effectuées en même temps, de l'infection virale jusqu'à révélation du western blot. Les résultats semblent favoriser une meilleure extraction des protéines par la méthode de sonication (**Figure 38, B**). Néanmoins, nous ne pouvons pas conclure sur la quantité et la solubilité des protéines pUL89 extraites. Les profils de migration électrophorétique révèlent plusieurs bandes protéiques pour les fractions d'élution (E1 et E2) mais la bande caractéristique visible pour la protéine pUL89 vers 72 kDa n'est pas majoritaire. Les analyses par western blot ne nous ont pas permis de détecter spécifiquement la présence de la protéine pUL89 dans le lysat ou dans les fractions récupérées à chaque étape de purification. pUL89 est probablement faiblement exprimée et/ou exposée la dégradation protéique.

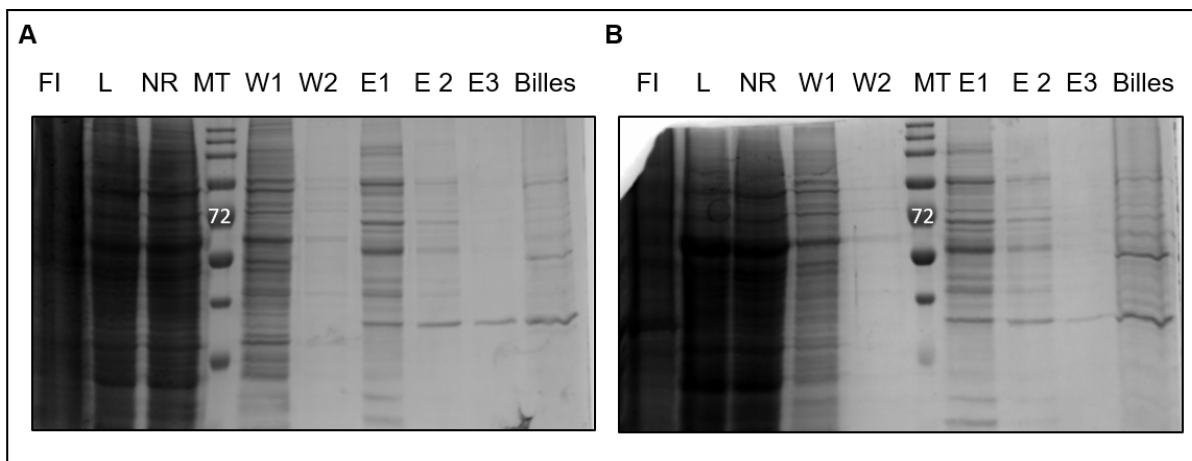


Figure 38 : Purification sur billes de la protéine pUL89 après différentes méthodes de lyse.

A. Méthode congélation/décongélation et **B.** méthode par sonication.

MT : Marqueur de taille (NEB #P7719), FI : Fraction Insoluble, L : Lysat, NR : Non retenu, W1 et W2 : lavage 1 et 2, E1, E2 et E3 : Élution 1,2 et 3.

D'autres purifications ont été réalisées après une lyse par sonication. Les profils de migration électrophorétique sont représentés dans la **figure 39, A et B**. L'extraction des bandes encadrées en rouge sur les gels colorés au bleu de Coomassie est effectuée pour analyse de la composition protéique par spectrométrie de masse (**Figure 39, A et B**). La présence de pUL89 est confirmée dans le lysat cellulaire (L), dans le lavage 1 (W1), dans les éluions (E1-E2) et dans les billes (**Figure 39, C**). Cependant, entre deux purifications réalisées (**A et B**), des résultats différents sont obtenus.

Dans le cas **A** : pUL89 est identifiée dans le lysat (bande A1 ; 18 peptides – 27,8 % de couverture et bande A2 ; peptides : 23 – 24,1 % de couverture), dans le lavage (bande A3 ; peptides : 26 – 34,7 % de couverture) et dans l'éluion (bande A4 ; peptides : 25 – 23,5 % de couverture). Ces résultats sont en faveur d'une perte protéique au cours de la purification.

Dans le cas **B** : pUL89 est formellement identifiée sur les billes après purification (bande B5 : peptides : 51 – 39,7 % de couverture) mais pas dans les autres bandes excisées correspondant au lysat, à la fraction non retenue, au lavage 1 et aux éluions (B1, B2, B3 et B4).

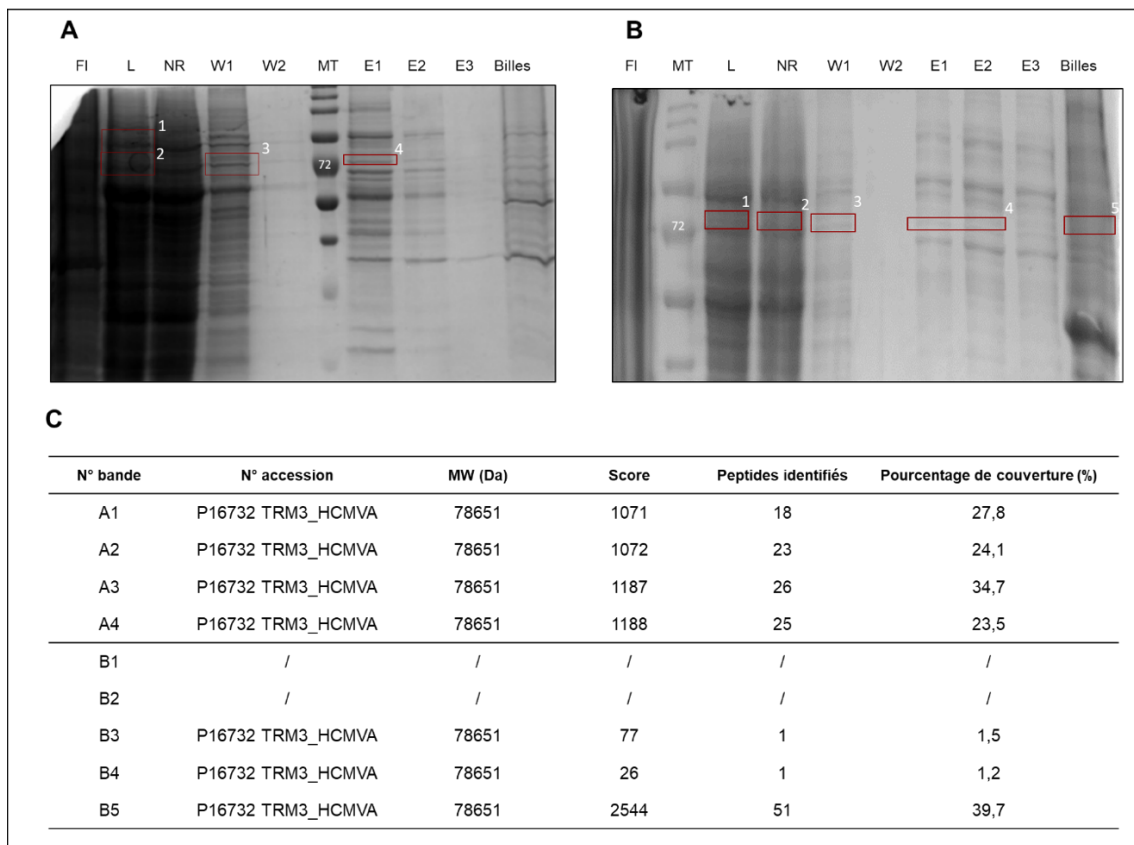


Figure 39 : Purification des protéines pUL89 et analyse de pUL89 par spectrométrie de masse. Migrations et colorations au bleu de Coomassie après purification histidine (**A – B**). **A et B** représentent deux expériences indépendantes de purification des protéines pUL89 à partir de lysat soniqués. MT : Marqueur de taille (NEB #P7719), FI : Fraction Insoluble, L : Lysat, NR : Non retenu, W1 et W2 : lavage 1 et 2, E1, E2 et E3 : Éluion 1,2 et 3. Les encadrés rouges correspondent aux bandes analysées par spectrométrie de masse. **C**. Tableau des résultats d'analyses par spectrométrie de masse.

3.5.1 Production et purification de la protéine pUL56 recombinante

Les western blots réalisés sur les lysats de cellules *Sf9* infectées ou co-infectées par les baculovirus recombinants (AcMNPV [UL56] et AcSLP10 [UL89]) n'ont pas permis d'identifier pUL56. Les résultats sont identiques, quel que soit l'anticorps utilisé (anti-HIS, anti-HA et anti-TEV). Une purification sur billes magnétiques Ni-NTA est tout de même réalisée afin de comparer les profils d'élution des lysats issus de cellules infectées par AcMNPV [UL56] et co-infectées par les virus AcMNPV [UL56] et AcSLP10 [UL89] (**Figure 40**). Les profils ne permettent pas une identification de la protéine pUL56 dans la piste 1 et des protéines pUL56 et pUL89 dans la piste 2 (**Figure 40, A et B**). Une analyse par spectrométrie de masse est effectuée sur l'ensemble des bandes majoritaires dans les pistes 1 et 2 à partir du gel coloré bleu de Coomassie. Seule la présence de pUL89 est validée dans l'élution 1 de la piste 2 (encadré en rouge) correspondant aux cellules co-infectées (**Figure 40, A et C**). Aucun signal à cette taille n'est observé par western blot (**Figure 40, B**).

La coloration au bleu de Coomassie du gel (**Figure 40, A**) et le western blot (**Figure 40, B**) révèlent de faibles bandes de faible intensité dans le témoin négatif correspondant à des cellules infectées par un baculovirus recombinant produisant une protéine intracellulaire ne portant pas l'étiquette polyhistidine. Ces bandes constituent donc un ensemble de protéines se fixant de manière non spécifique aux billes magnétiques et reconnues de manière non spécifique par l'anticorps utilisé (#MA1-21 315, ThermoFisher Scientific, USA).

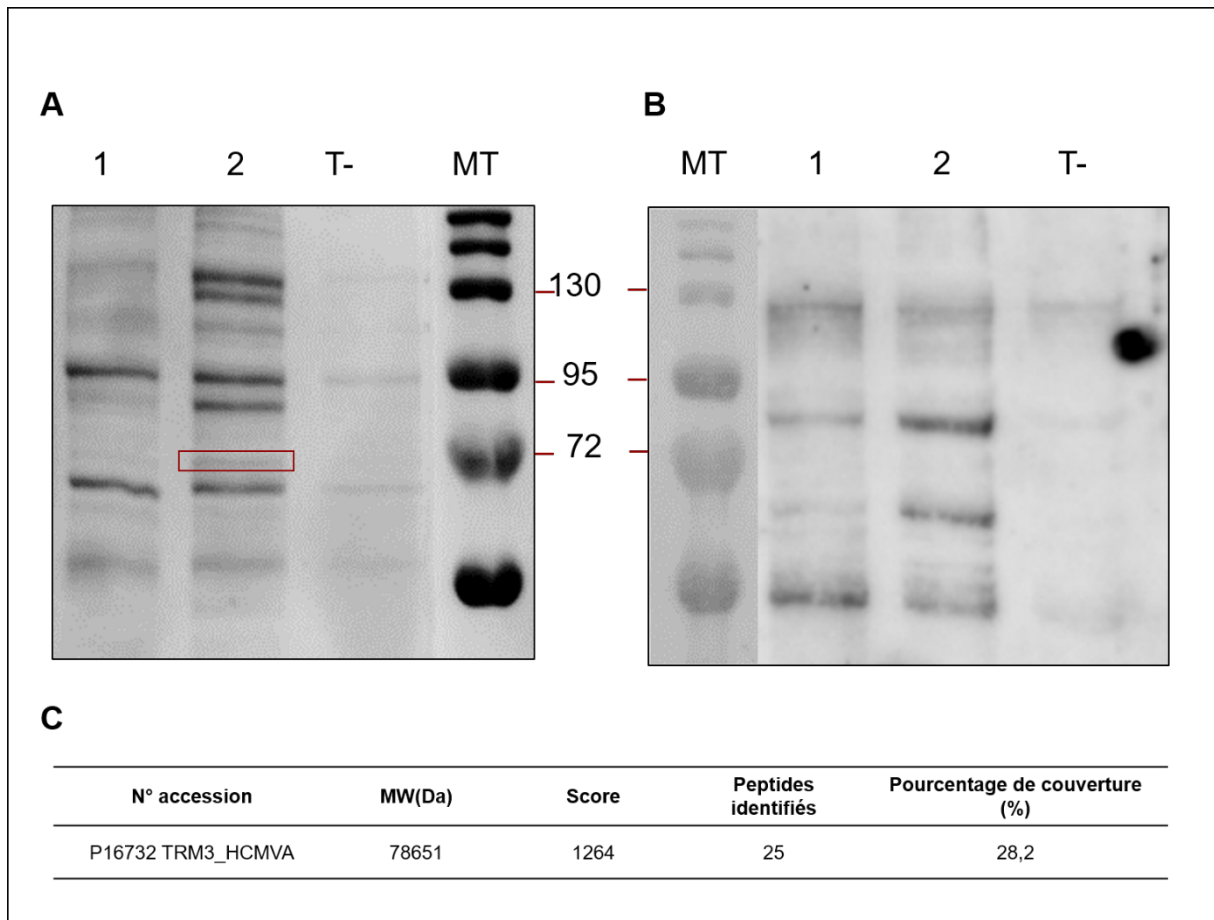


Figure 40 : Purification des protéines pUL56 et pUL89 à partir de lysats infectés AcMNPV [UL56] ou co-infectés AcMNPV [UL56] et AcSLP10 [UL89].

A. Analyse électrophorétique sur gel coloré au bleu de Coomassie des protéines contenues dans les fractions d'élution après purification de pUL56 (piste 1) ou co-purification de pUL56 et pUL89 (piste 2) sur billes magnétiques Ni-NTA. **B.** Western blot effectué en parallèle. **C.** Tableau des résultats de l'analyse en spectrométrie de masse.

T- : Lysat de cellules infectées produisant une protéine intracellulaire non étiquetée. Rectangle rouge représente une des bandes protéiques analysées par spectrométrie de masse, qui contient pUL89. MT : marqueur de taille (NEB #P7719).

CONCLUSIONS ET PERSPECTIVES

Mécanisme d'action du letermovir

Le letermovir est une molécule ciblant l'étape d'encapsidation de l'ADN viral. Son mécanisme d'action n'est pas totalement compris, mais l'apparition de mutations de résistance est en faveur de l'implication des protéines pUL56, pUL89 et plus récemment de la protéine pUL51. Suite à des expériences de sélection *in vitro* en présence de letermovir, une mutation de résistance (P91S) a émergé dans pUL51. Cette mutation n'a jamais été retrouvée dans des souches cliniques.

L'étude détaillée dans la PARTIE 1 a permis la **mise en évidence l'implication de la protéine pUL51 dans le mécanisme de résistance du CMVH au letermovir.**

Nous avons séquencé le gène codant pUL51 en plus de ceux codant pUL56 et pUL89 chez 16 patients non répondeurs au letermovir. Afin d'identifier de potentielles mutations de résistance dans pUL51, nous avons comparé ces résultats avec les données de polymorphisme que nous avons déterminées en parallèle. Ainsi, nous avons détecté 4 nouvelles mutations par séquençage Sanger et NGS (D12E, 17del, A95V, V113L). Ces 4 substitutions proviennent de patients différents, certains d'entre eux possèdent également une mutation de résistance déjà caractérisée dans pUL56. (**Tableau 10**).

Tableau 10 : Caractéristiques des échantillons cliniques.

Numéro d'accession	UL56	UL89	UL51	Transplantation	Traitement	Charge virale (log IU.mL ⁻¹)
ON505132	L257I	WT	A95V	HSC	LMV prophylaxie	3,21
ON505138	C325Y	WT	V113L	HSC	LMV prophylaxie	3,12
ON505141	C325F	WT	D12E	Rein	LMV curatif	3,40
ON505147	WT	WT	17del	Poumons	LMV curatif	5,40

LMV : letermovir, WT : Wild Type, del : délétion, HSC : cellules souches hématopoïétiques.

Afin d'étudier ces substitutions, des virus recombinants ont été générés par la méthode des BAC. Seule la mutation UL51-A95V confère une résistance au letermovir. Par ailleurs, les 4 substitutions étudiées n'impactent pas la capacité de croissance du virus. Des virus doubles mutants (UL56/UL51) ont été construits selon le tableau 10 afin d'évaluer l'impact des deux mutations sur la résistance au letermovir.

Seule, la combinaison des mutations UL51-A95V et UL56-L257I augmente la résistance au letermovir d'un facteur 127,8. Les autres combinaisons ne nous permettent pas de définir le niveau de résistance précis, car celui-ci est trop élevé.

D'un point de vue clinique, il serait intéressant d'analyser l'émergence respective des mutations dans les protéines pUL51 et pUL56 pour comprendre les mécanismes de résistance. Cependant nous n'avons pas accès aux échantillons antérieurs pour effectuer ces recherches, les seules informations disponibles sont recensées dans le tableau 10.

La caractérisation d'une substitution non décrite constitue un travail essentiel pour l'établissement des cartes de résistance et de polymorphisme. En effet, elles permettent d'améliorer la prise en charge d'un patient par l'adaptation du traitement et constituent un ensemble d'informations importantes pour la compréhension du fonctionnement du complexe et du mécanisme d'action du letermovir.

Néanmoins, la génération d'un virus recombinant est une méthode relativement onéreuse et chronophage. Bien qu'il soit essentiel de développer des cartes des mutations de résistance et de polymorphisme exhaustives, ces caractérisations ne permettent pas d'apporter une réponse rapide suite à la découverte d'une ou plusieurs nouvelles mutations. Ainsi une approche bio-informatique permettrait d'anticiper les résultats et d'adapter la prise en charge clinique plus rapidement.

Grâce à l'essor des calculs permettant la modélisation protéique et au modèle structural du complexe terminase de l'HSV-1, nous pouvons visualiser en 3D les hot spots des mutations de résistance. Une nouvelle substitution figurant dans ce hot spot serait à prioriser plutôt qu'une située dans une région hébergeant beaucoup de polymorphismes.

Ainsi les outils bio-informatiques et la caractérisation phénotypique de mutations sont des moyens complémentaires à la compréhension du fonctionnement du virus.

Identification et validation de cibles thérapeutiques

La compréhension des protéines impliquées dans le complexe terminase est essentielle pour identifier de nouvelles cibles thérapeutiques et pour le développement de nouvelles molécules. Par une approche bio-informatique puis de mutagenèse dirigée nous avons pu identifier des motifs essentiels à la réplication virale dans les protéines pUL51 et pUL52.

L'étude de pUL51 a permis **(I)** d'identifier des leucines conservées chez les bêta-herpèsvirus présentes à espace régulier dans la région C-terminale de cette protéine et **(II)** de montrer leur importance dans la réplication virale. En effet, les substitutions de ces leucines en alanines altèrent la réplication virale ce qui suppose que ce motif est essentiel pour la structure-fonction de pUL51. **(III)** De tester l'efficacité d'un peptide mimant ce motif pour inhiber la réplication virale.

Les motifs de type Leucine Zipper sont fréquemment présents dans des protéines régulatrices ou dans des facteurs de transcription (Alber, 1992) et sont présents dans de grandes variétés d'organismes (aussi bien chez les plantes, que les animaux et les virus) (Alber, 1992). Ils sont impliqués dans des interactions protéine-protéine ou protéine-ADN. Ainsi, cette approche visant au développement d'une molécule mimant ce motif comportait un risque d'entraîner une toxicité cellulaire due à des reconnaissances/interactions non spécifiques du peptide. Néanmoins, l'alignement de notre séquence dans la Genbank en utilisant les fonctions BlastP ne nous a pas permis d'identifier de motifs similaires chez des protéines humaines. Par ailleurs, les tests de cytotoxicité effectués ne montrent pas de toxicité aux concentrations testées. Une stratégie similaire à la nôtre a été envisagée par l'équipe du Dr Jean-Luc Poyet (UMR-S 940); un peptide imitant le motif leucine zipper d'une protéine impliquée dans les mécanismes de régulation de l'apoptose chez l'homme (AAC-11) a été développé. Cette protéine (AAC-11) est surexprimée dans la plupart des cellules cancéreuses, ainsi son inactivation constitue une approche intéressante pour le développement de nouvelles thérapies contre le cancer. Le peptide anti-AAC-11 développé n'entraîne pas de toxicité pour les cellules et son administration chez des souris inhibe la croissance des xénogreffes de tumeurs de mélanome (Jagot-Lacoussiere et al., 2016; Rigou et al., 2009). Bien que ces données soient très encourageantes pour le traitement du mélanome (et probablement d'autres cancers), notre peptide TAT-KH29 mimant le motif LZ de pUL51 nécessite d'être optimisé puisqu'il présente une faible activité anti-CMVH (diminution d'environ 25 % du

nombre de foyers infectieux 5 jours post-infection). Il constitue cependant un point de départ potentiel pour le développement de thérapies.

Le développement de peptides ciblant le motif dans pUL56 décrit par notre unité est en cours, ils valident la cible thérapeutique publiée et brevetée en 2017 (Ligat et al., 2017). Les premiers résultats obtenus pour des peptides ciblant l'interaction pUL56-pUL89 permettent une diminution du nombre de foyers infectieux à 5 jours post-infection d'environ 20 à 30 % à des concentrations micromolaires. De façon similaire au peptide TAT-HK29, ces peptides semblaient former des précipités en milieu de culture (*données non publiées*).

L'inconvénient principal de notre approche est probablement l'acheminement du peptide jusqu'à sa cible *in vitro*. Nos séquences peptidiques, principalement hydrophobes apparaissent peu solubles et forment des précipités limitant alors la pénétration cellulaire.

Après la reconstitution tridimensionnelle de la capsidie du KSHV, les auteurs Dai et Gong ont identifié une zone d'interaction forte entre la SCP et la MCP. Par le développement de plusieurs peptides mimant ce motif d'interaction, ils ont pu montrer que leur expression réduit la production de virions d'environ 90 % (Dai et al., 2018). À la différence de notre stratégie, Dai et Gong ont transfecté des cellules infectées par le KSHV avec des vecteurs permettant la production des différents peptides, ainsi ils s'affranchissent des problèmes de solubilité.

Ces travaux fournissent de nouvelles données sur la structure et la fonction de pUL51. Le motif LZ de pUL51 pourrait devenir un point de départ possible pour le développement de nouvelles thérapies ciblant le CMVH.

La protéine pUL52, peu étudiée est une protéine essentielle pour la réplication virale et pour le bon déroulement de l'étape d'encapsidation. Bien que son rôle dans cette étape ne soit pas élucidé, l'étude menée sur pUL52 nous a permis d'identifier des motifs essentiels à la réplication virale. Ces motifs sont situés dans les régions conservées **I**, **II** et **III**. Les régions conservées **II** et **III** se situent dans la partie C-terminale de la protéine où le polymorphisme naturel est faible. La construction d'un virus recombinant par Borst *et al.* en 2008 portant une étiquette sur la partie C-terminale de pUL52 entraînait l'absence de réplication virale (Borst et al., 2008). Ces deux observations suggèrent que la partie C-terminale de pUL52 est essentielle pour sa fonction. Nos résultats sont en accord avec ceux décrits en 2008.

Au cours de notre travail, nous avons pu montrer que la protéine pUL52 est une protéine riche en cystéines composée de 3 régions conservées et de 2 régions variables. Elle comprend des motifs de type doigt de zinc et CXXC essentiels pour la réplication virale.

La comparaison du polymorphisme des souches cliniques naïves de tout traitement et celles issues de patients traités nous a permis d'identifier 6 substitutions dans pUL52. Les 6 substitutions identifiées ont été étudiées afin d'écarter leur implication dans une résistance au letermovir. Comme supposé, ces mutations ne confèrent pas de résistance au letermovir et ne changent pas la capacité du virus à répliquer. **L'implication de cette protéine dans le mécanisme d'action et de résistance au letermovir est écartée.**

De nos jours, les protéines pUL77, pUL93 demeurent peu étudiées bien que leur implication dans le mécanisme d'encapsidation ait été démontrée. L'étude de ces protéines par notre approche pourrait permettre d'identifier de nouvelles cibles.

Études des protéines pUL56 et pUL89

La production des protéines est une étape délicate, mais nécessaire pour la compréhension du complexe terminase et du fonctionnement du letermovir. Le dernier objectif de ce travail de thèse était de produire les protéines pUL56 et pUL89, afin de les étudier notamment en effectuant des tests d'interaction en présence de letermovir.

En raison de nos précédentes expériences (système d'expression bactérien et mammalien), le système d'expression baculovirus-cellules d'insectes a été choisi (Hantz, thèse d'université, 2009; Ligat, thèse d'université, 2017). Ce système repose en la construction d'un baculovirus recombinant ayant intégré, après recombinaison homologue, la séquence codant la protéine d'intérêt en aval du promoteur fort et tardif du gène de la polyédrine (Pe) ou de celui du gène de la protéine P10.

Obtention de baculovirus recombinants pour exprimer pUL56 et pUL89 dans les cellules d'insectes *Sf9*

Pour construire un baculovirus recombinant, plusieurs étapes sont nécessaires allant du design des inserts souhaités à l'obtention par recombinaison homologue d'un baculovirus après transfection des cellules d'insectes *Sf9*.

Ici, notre objectif était de tester par la technologie ALPHA, l'interaction des protéines pUL56 et pUL89 en présence de letermovir. L'ajout des étiquettes HA et 6xHIS s'est respectivement porté sur les extrémités N-terminales des protéines pUL56 et pUL89 en raison des études démontrant l'importance des régions C-terminales pour leur interaction (Ligat et al., 2017; Thoma et al., 2006). Dans l'objectif de purifier pUL56, nous avons également ajouté à son extrémité C-terminale une étiquette 6xHIS clivable, du fait de l'ajout du site de clivage de la protéase TEV en amont de celle-ci. Enfin, des sites de restriction sont ajoutés de part et d'autre des séquences afin de pouvoir les cloner dans les vecteurs de transfert baculovirus pGmAc116T (Pe) et p119 (P10). Les amplifications non spécifiques observées à la première PCR n'ont pas d'impact sur l'exécution de la deuxième PCR où le profil de migration ne révèle qu'une bande à la taille attendue.

En raison d'une probable digestion partielle de leurs extrémités, le clonage direct des produits de PCR dans les vecteurs de transfert a été infructueux. Une étape de sous-clonage dans le pGEM-T easy a été nécessaire afin de libérer les inserts d'intérêt correctement digérés à leurs deux extrémités. Après purification et ligation des fragments d'intérêt dans les vecteurs de transfert baculovirus (pGmAc116T ou p119), la bonne orientation des inserts au niveau de

sites uniques a été vérifiée par séquençage, en vérifiant particulièrement les jonctions vecteurs-inserts.

La méthode que nous avons utilisée pour générer des baculovirus recombinants est la méthode classique non commerciale. Elle repose sur la recombinaison homologe entre le génome viral et un vecteur de transfert portant la séquence d'intérêt sous le contrôle du promoteur fort Pe ou P10 après transfection des cellules d'insectes *Sf9*.

La sélection des baculovirus recombinants repose sur la technique des plages de lyse. Cette technique consiste à identifier visuellement au microscope optique les plages infectieuses de phénotype Ob⁻, c'est-à-dire des cellules infectées sans polyèdres. Son principal inconvénient est sa très faible fréquence de recombinaison (en général, 1 plage de lyse sur 100 est potentiellement Ob⁻), ce qui rend le processus de sélection virale fastidieux. Une optimisation de la méthode utilisée aurait pu être envisagée en linéarisant l'ADN viral au niveau d'un site de restriction unique avant l'étape de co-transfection avec les vecteurs de transfert. Cela permettrait d'augmenter le pourcentage de recombinaison et faciliter ainsi grandement la recherche de plage de lyse Ob⁻ (van Oers, 2011).

La purification du baculovirus recombinant nécessite une étape de carottage de la plage Ob⁻ identifiée et la réalisation d'une suspension virale par dilution dans du milieu TC-100 sans sérum de veau fœtal. La première étape de sélection du baculovirus par la technique des plages de lyse à partir des surnageants de co-transfection génère comme dit précédemment 99 % de plages virales sauvages Ob⁺. Afin de s'assurer de la pureté de la suspension virale précédemment prélevée, plusieurs étapes de plages de lyse sont parfois nécessaires jusqu'à obtention de 100 % de plages Ob⁻. Une fois pur, le baculovirus recombinant est amplifié jusqu'à un titre maximal par 3 étapes successives d'infections. Cette technique classique nécessite un minimum de 6 à 8 semaines entre la co-transfection et l'obtention d'un baculovirus recombinant pur et amplifié à son maximum.

Dans les cas des co-transfections réalisées pour produire pUL89 et pUL56 dans les cellules *Sf9*, seules deux plages de lyse Ob⁻ (pouvant être assimilés à deux clones différents) ont été identifiées par la technique des plages de lyse. Étant donné que l'obtention des baculovirus recombinants se fait par recombinaison homologe et toujours au même locus, il n'est pas attendu pour un même baculovirus de différences majeures de stabilité et de pouvoir infectieux entre deux clones (issus de plages Ob⁻ différentes). Cependant, il n'est pas exclu que dans certains cas, des remaniements génétiques puissent affecter la réplication et/ou la stabilité virale. Afin de comparer le niveau de production des différents clones, nous avons effectué des western blot. Malheureusement, la faible spécificité des anticorps utilisés en

western blot ne nous a pas permis de comparer le profil d'expression de chaque protéine recombinante en fonction des différents clones isolés. Nous avons donc choisi pour produire pUL89 et pUL56 de continuer avec le clone viral recombinant qui semblait avoir le meilleur pouvoir infectieux. Par ailleurs, nous avons choisi la technique de Hirt pour montrer, après extraction d'ADN viral et PCRs spécifiques, que les baculovirus recombinants sélectionnés avaient bien intégré les séquences souhaitées en aval des promoteurs forts Pe ou P10.

Après validation de l'obtention de baculovirus recombinants purs et amplifiés, les étapes de production et de purification des protéines recombinantes pUL56 et pUL89 ont pu être effectuées.

Production des protéines recombinantes pUL56 et pUL89

La production des protéines est effectuée avec les baculovirus recombinants AcMNPV [UL56] et AcSLP10 [UL89] préalablement validés, purifiés et amplifiés. Seule la protéine pUL89 a été formellement identifiée par western blot et par spectrométrie de masse dans les lysats de cellules infectées avec le baculovirus AcSLP10 [UL89]. En raison des difficultés d'identification des protéines par western blot, les quantités de protéines recombinantes produites n'ont pas pu être déterminées. Néanmoins, nous pensons qu'elles sont faibles à la vue des profils de migrations de lysats cellulaires analysés par SDS-PAGE après coloration du gel au bleu de Coomassie. En effet, aucune surexpression majeure n'a pu être révélée pour pUL56 et pUL89.

La durée d'infection et la multiplicité d'infection (MOI), qui correspond au nombre de particules virales infectieuses par cellule, sont deux paramètres importants à déterminer pour optimiser la production des protéines recombinantes. Infecter avec différentes MOI et sur des temps différents permettrait de déterminer les meilleurs paramètres possibles pour la production. Les protéines pUL89 et pUL56, étant des protéines intracellulaires et nucléaires, nous avons favorisé une infection de 2 à 3 jours pour éviter une lyse trop importante des cellules infectées. En effet, en cas d'infection trop longue ou avec une MOI trop forte, les cellules finissent par être totalement lysées, augmentant ainsi le risque de protéolyse des protéines d'intérêt. Cette protéolyse est un problème connu dû à l'expression de protéases virales telles que la cathepsine et la chitinase (van Oers, 2011). Nous pouvons suggérer ici une dégradation des protéines pUL89 ou pUL56 par ces protéases. Pour pallier ce problème, les gènes codant ces enzymes peuvent être délétés ou des inhibiteurs peuvent être ajoutés au milieu de production. Avec les difficultés rencontrées pour le suivi des protéines par western blot, nous n'avons pas pu déterminer les meilleurs paramètres pour la production. Par ailleurs, pour optimiser les rendements de production, la culture de cellules en suspension pourrait être

envisagée et permettrait d'obtenir un plus grand nombre de cellules infectées (jusqu'à 1 107 cellules par mL) dans un volume plus restreint (50 mL), ce qui est en plus un gain de temps et d'argent. De plus, plusieurs milieux de culture commerciaux tel que le milieu EX-CELL 420 (Sigma-aldrich, USA) sont spécialement formulés et optimisés pour la production de protéines recombinantes par les cellules Sf9 en l'absence de sérum de veau fœtal. L'expression des protéines et la production de virus s'en trouvent améliorées par rapport aux milieux contenant du sérum, tel que le milieu TC-100 supplémenté utilisé lors de ce projet.

Lors de la production de protéines, il a été également décrit que le choix des étiquettes ajoutées aux protéines pouvait largement impacter la qualité de la production (production, stabilité et reconnaissance des protéines) et remettre en question tout le processus. Pour la technologie ALPHA, nous étions contraints de produire une protéine avec une étiquette 6xHIS et l'autre étiquetée HA. Nous avons fait le choix de les placer aux extrémités N-terminales sachant que les extrémités C-terminales sont essentielles pour les interactions (Ligat et al., 2017; Thoma et al., 2006). Nos précédentes expériences par western blot nous ont appris que les anticorps anti-HA ne nous permettaient pas de détecter facilement pUL56 (Ligat, thèse d'université, 2017; données personnelles). Ainsi, pour faciliter le suivi par western blot et pour faciliter la purification, nous avons rajouté à l'extrémité C-terminale le site de clivage de la protéase TEV suivi de six histidines. L'objectif était d'éliminer l'étiquette 6xHIS après action de la protéase TEV, libérant ainsi l'extrémité C-terminale de pUL56 nécessaire aux interactions protéine-protéine, conditionnant la réussite de la technologie ALPHA.

Cette solution, plutôt satisfaisante de prime abord, est peut-être devenue une limite à notre travail de production de protéine. Étant donné l'importance de la partie C-terminale de pUL56 pour sa fonction, nous aurions plutôt dû ajouter ces étiquettes à l'extrémité N-terminale. De plus, compte tenu des difficultés rencontrées pour le suivi des protéines par western blot, le choix de ces étiquettes est à remettre en question. Contrairement aux étiquettes 6xHIS, HA et TEV, l'étiquette V5 (14 résidus) peut être identifiée de manière très spécifique par les anticorps anti-V5. Enfin, il se pourrait que les protéines pUL56, pUL89 et pUL51, ensemble, se protègent les unes les autres de la protéolyse (Neuber et al., 2017). D'après les données bio-informatiques, la protéine pUL56 est prédite comme non stable. Ainsi, coproduire simultanément ces protéines pourrait faciliter l'assemblage du complexe et améliorer leur stabilité afin d'augmenter les rendements (impliquant alors l'absence d'étiquette aux extrémités C-terminales). Une expérience de purification à partir de cellules co-infectées par AcMNPV [UL56] et AcSLP [UL89] a été réalisée. Uniquement pU89 a été identifiée dans la fraction d'élution (25 peptides — 28 % de couverture) (**Figure 38, C**). De plus, ces résultats sont similaires à une des purifications réalisées à partir de cellules infectées avec AcSLP

[UL89] (25 peptides — 23 % de couverture) (**Figure 37, C**). Par ailleurs, cette approche pourrait limiter les expériences d'interaction protéine-protéine avec la technologie ALPHA.

La résolution tridimensionnelle du complexe d'encapsidation de l'HSV-1 a été notamment réalisée par la co-production des protéines pUL28, pUL15 et pUL33 en cellules d'insectes avec différent baculovirus recombinants. Dans cette étude, seul pUL15 (homologue de pUL89) portait une étiquette 6xHIS suffisante pour la reconnaissance et la purification de tout le complexe (Yang et al., 2020). La purification avait ensuite été effectuée sur colonne avec l'appareil ÄKTA. Une étude similaire pourrait être envisagée pour le CMVH.

Purification des protéines recombinantes pUL56 et pUL89

Les étapes de purification ont également pu être limitantes. Nous avons favorisé, dans un premier temps, l'utilisation de billes magnétiques chélatées au nickel (billes Ni-NTA) pour tenter de purifier les protéines étiquetées 6xHIS. Cette méthode sensible annonce pour 50 μ L de billes un rendement de 15 μ g de protéines pures. Les profils de migration des fractions d'élution montrent une multitude de bandes confirmant la présence de contaminants. Les analyses par spectrométrie de masse de deux expériences indépendantes montrent des résultats disparates concernant pUL89.

Dans un des cas, les analyses par spectrométrie de masse ont montré qu'une large quantité de protéines était éluée lors de l'étape de lavage 1 (26 peptides — 34,7 % de couverture) (**Figure 38, A**). Afin de limiter l'élution précoce, les tampons de liaison et de lavage (tampon B et C) pourraient contenir moins d'imidazole. Par ailleurs, les conditions expérimentales ne permettent peut-être pas une accessibilité de l'étiquette 6xHIS du fait des repliements protéiques. Des tentatives de purification en conditions dénaturantes pourraient alors être envisagées, elles permettraient certainement une meilleure fixation des protéines aux billes magnétiques. Cependant la dénaturation des protéines implique une étape délicate pour assurer le bon repliement de la protéine afin d'exercer les tests d'interaction.

Dans le second cas, les analyses par spectrométrie de masse ont montré qu'une large quantité de protéine restait fixée aux billes magnétiques (51 peptides — 39 % de couverture) (**Figure 38, B**). Afin de favoriser l'élution des protéines après les étapes de lavages, un tampon d'élution (tampon C) plus concentré en imidazole et/ou avec un pH plus faible pourrait être envisagé. Cependant un équilibre doit être trouvé puisqu'un pH trop proche du pHi des protéines entraînerait leur précipitation et une concentration plus importante en imidazole favoriserait la présence de contaminant (déjà présents dans nos conditions). Par ailleurs, une très faible identification des protéines pUL89 a été validée par spectrométrie de masse dans les étapes de lavage 1 et dans les éluions, ces résultats ne permettent pas de valider sa

présence. De plus, les bandes prélevées dans les pistes correspondant au lysat et à la fraction non retenue ne présentent pas la protéine pUL89 après analyses par spectrométrie de masse. À la vue de la quantité de protéines pUL89 identifiées dans les billes, il est surprenant de ne pas avoir également identifié les protéines pUL89 dans le lysat. Une erreur expérimentable lors de l'excision des bandes sur le gel de polyacrylamide est à envisager.

Ces résultats, bien qu'encourageants ne nous permettent pas d'obtenir des fractions de protéines pures. Un ensemble d'optimisation doit être envisagé pour (I) produire en plus large quantité, (II) être en mesure de suivre la production par western blot et (III) pour purifier la protéine et tenter des tests d'interaction.

CONCLUSION GÉNÉRALE

Au cours de ce travail de thèse, nous avons ainsi identifié de nouvelles cibles potentielles au niveau des protéines pUL51 et pUL52 impliquées dans l'encapsidation de l'ADN viral qui pourraient permettre de conduire au développement de nouvelles thérapies anti-CMVH présentant peu d'effets secondaires du fait de leur grande spécificité.

Nous avons participé à améliorer la compréhension du mécanisme d'action du letermovir, grâce à l'apport d'un modèle tridimensionnel théorique du complexe terminase basé sur l'homologie structurale avec HSV-1. Nous avons également confirmé l'absence de rôle de pUL52 dans le mode d'action du letermovir.

Nous espérons que ces travaux contribueront à optimiser, à terme, la prise en charge des infections à CMVH, en disposant de stratégies thérapeutiques alternatives pour éviter les effets indésirables et efficaces en cas de multirésistance.

RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- Aiba, N., Shiraki, A., Yajima, M., Oyama, Y., Yoshida, Y., Ohno, A., Yamada, H., Takemoto, M., Daikoku, T., Shiraki, K., 2017. Interaction of Immunoglobulin with Cytomegalovirus-Infected Cells. *Viral Immunol.* 30, 500–507. <https://doi.org/10.1089/vim.2016.0151>
- Alain, S., Mazon, M.C., Denis, F., 2004. Résistance du cytomegalovirus au ganciclovir. *Antibiotiques* 6, 113–119. [https://doi.org/10.1016/S1294-5501\(04\)94251-3](https://doi.org/10.1016/S1294-5501(04)94251-3)
- Alber, T., 1992. Structure of the leucine zipper 6.
- Albright, B.S., Kosinski, A., Szczepaniak, R., Cook, E.A., Stow, N.D., Conway, J.F., Weller, S.K., 2015. The Putative Herpes Simplex Virus 1 Chaperone Protein UL32 Modulates Disulfide Bond Formation during Infection. *J. Virol.* 89, 443–453. <https://doi.org/10.1128/JVI.01913-14>
- Andouard, D., Mazon, M.-C., Ligat, G., Couvreur, A., Pouteil-Noble, C., Cahen, R., Yasdanpanah, Y., Deering, M., Viget, N., Alain, S., Hantz, S., 2016. Contrasting effect of new HCMV pUL54 mutations on antiviral drug susceptibility: Benefits and limits of 3D analysis. *Antiviral Res.* 129, 115–119. <https://doi.org/10.1016/j.antiviral.2016.02.004>
- Arvin, A., Arvin, A.M., 2007. Human herpesviruses: biology, therapy, and immunoprophylaxis. Cambridge University Press, Cambridge; New York.
- Aryal, S., Katugaha, S.B., Cochrane, A., Brown, A.W., Nathan, S.D., Shlobin, O.A., Ahmad, K., Marinak, L., Chun, J., Fregoso, M., Desai, S., King, C., 2019. Single-center experience with use of letermovir for CMV prophylaxis or treatment in thoracic organ transplant recipients. *Transpl. Infect. Dis.* 21. <https://doi.org/10.1111/tid.13166>
- Avery, R.K., Alain, S., Alexander, B.D., Blumberg, E.A., Chemaly, R.F., Cordonnier, C., Duarte, R.F., Florescu, D.F., Kamar, N., Kumar, D., Maertens, J., Marty, F.M., Papanicolaou, G.A., Silveira, F.P., Witzke, O., Wu, J., Sundberg, A.K., Fournier, M., for the SOLSTICE Trial Investigators, 2021. Maribavir for Refractory Cytomegalovirus Infections With or Without Resistance Post-Transplant: Results From a Phase 3 Randomized Clinical Trial. *Clin. Infect. Dis.* <https://doi.org/10.1093/cid/ciab988>
- 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., Filho, H.H.C., Pannuti, C.S., Lopes, M.H., dos Santos, V.A., da Cruz Gouveia Linardi, C., Yasuda, M.A.S., de Sousa Marques, H.H., 2015. Cytomegalovirus infection in transplant recipients. *Clinics* 70, 515–523. [https://doi.org/10.6061/clinics/2015\(07\)09](https://doi.org/10.6061/clinics/2015(07)09)
- Baker, M.L., Jiang, W., Rixon, F.J., Chiu, W., 2005. Common Ancestry of Herpesviruses and Tailed DNA Bacteriophages. *J. Virol.* 79, 14967–14970. <https://doi.org/10.1128/JVI.79.23.14967-14970.2005>
- Berger, I., Fitzgerald, D.J., Richmond, T.J., 2004. Baculovirus expression system for heterologous multiprotein complexes. *Nat. Biotechnol.* 22, 1583–1587. <https://doi.org/10.1038/nbt1036>
- 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.* 82, 2473–2477. <https://doi.org/10.1073/pnas.82.8.2473>
- Boeckh, M., Murphy, W.J., Peggs, K.S., 2015. Reprint of: Recent Advances in Cytomegalovirus: An Update on Pharmacologic and Cellular Therapies. *Biol. Blood Marrow Transplant.* 21, S19–S24. <https://doi.org/10.1016/j.bbmt.2014.12.034>
- Boeckh, M., Nichols, W.G., 2004. The impact of cytomegalovirus serostatus of donor and recipient before hematopoietic stem cell transplantation in the era of antiviral prophylaxis and preemptive therapy. *Blood* 103, 2003–2008. <https://doi.org/10.1182/blood-2003-10-3616>
- Bogner, E., 2002. Human cytomegalovirus terminase as a target for antiviral chemotherapy. *Rev. Med. Virol.* 12, 115–127. <https://doi.org/10.1002/rmv.344>
- 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, 6.

- Bogner, E., Reschke, M., Reis, B., Mockenhaupt, T., Radsak, K., 1993. Identification of the gene product encoded by ORF UL56 of the human cytomegalovirus genome. *Virology* 196, 290–293. <https://doi.org/10.1006/viro.1993.1477>
- Borst, E.M., Bauerfeind, R., Binz, A., Stephan, T.M., Neuber, S., Wagner, K., Steinbrück, L., Sodeik, B., Lenac Roviš, T., Jonjić, S., Messerle, M., 2016. The Essential Human Cytomegalovirus Proteins pUL77 and pUL93 Are Structural Components Necessary for Viral Genome Encapsidation. *J. Virol.* 90, 5860–5875. <https://doi.org/10.1128/JVI.00384-16>
- Borst, E.M., Kleine-Albers, J., Gabaev, I., Babić, M., Wagner, K., Binz, A., Degenhardt, I., Kalesse, M., Jonjić, S., Bauerfeind, R., Messerle, M., 2013. The Human Cytomegalovirus UL51 Protein Is Essential for Viral Genome Cleavage-Packaging and Interacts with the Terminase Subunits pUL56 and pUL89. *J. Virol.* 87, 1720–1732. <https://doi.org/10.1128/JVI.01955-12>
- Borst, E.M., Wagner, K., Binz, A., Sodeik, B., Messerle, M., 2008. The Essential Human Cytomegalovirus Gene UL52 Is Required for Cleavage-Packaging of the Viral Genome. *J. Virol.* 82, 2065–2078. <https://doi.org/10.1128/JVI.01967-07>
- Britt, W.J., Boppana, S., 2004. Human cytomegalovirus virion proteins. *Hum. Immunol.* 65, 395–402. <https://doi.org/10.1016/j.humimm.2004.02.008>
- Britt, W.J., Prichard, M.N., 2018. New therapies for human cytomegalovirus infections. *Antiviral Res.* 159, 153–174. <https://doi.org/10.1016/j.antiviral.2018.09.003>
- Cannon, M.J., Schmid, D.S., Hyde, T.B., 2010. Review of cytomegalovirus seroprevalence and demographic characteristics associated with infection: CMV seroprevalence. *Rev. Med. Virol.* 20, 202–213. <https://doi.org/10.1002/rmv.655>
- Chaabihi, H., Devauchelle, G., Cerutti, M., 1993. Competition between Baculovirus Polyhedrin and pLO Gene Expression during Infection of Insect Cells. *J VIROL* 67, 8.
- Champier, G., Couvreur, A., Hantz, S., Rametti, A., Mazon, M.-C., Bouaziz, S., Denis, F., Alain, S., 2008. Original article Putative functional domains of human cytomegalovirus pUL56 involved in dimerization and benzimidazole D-ribonucleoside activity. *Antivir. Ther.* 12.
- Champier, G., Hantz, S., Couvreur, A., Stuppfler, S., Mazon, M.-C., Bouaziz, S., Denis, F., Alain, S., 2007. New functional domains of human cytomegalovirus pUL89 predicted by sequence analysis and three-dimensional modelling of the catalytic site DEXDc. *Antivir. Ther.* 12, 217–232.
- Chang, Y.E., Poon, A.P., Roizman, B., 1996. Properties of the protein encoded by the UL32 open reading frame of herpes simplex virus 1. *J. Virol.* 70, 3938–3946. <https://doi.org/10.1128/jvi.70.6.3938-3946.1996>
- Chatzakis, C., Ville, Y., Makrydimas, G., Dinas, K., Zavlanos, A., Sotiriadis, A., 2020. Timing of primary maternal cytomegalovirus infection and rates of vertical transmission and fetal consequences. *Am. J. Obstet. Gynecol.* 223, 870-883.e11. <https://doi.org/10.1016/j.ajog.2020.05.038>
- Chee, M.S., Bankier, A.T., Beck, S., Bohni, R., Brown, C.M., Cerny, R., Horsnell, T., Hutchison, C.A., Kouzarides, T., Martignetti, J.A., 1990. Analysis of the protein-coding content of the sequence of human cytomegalovirus strain AD169. *Curr. Top. Microbiol. Immunol.* 154, 125–169. https://doi.org/10.1007/978-3-642-74980-3_6
- 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. Letemovir for Cytomegalovirus Prophylaxis in Hematopoietic-Cell Transplantation. *N. Engl. J. Med.* 370, 1781–1789. <https://doi.org/10.1056/NEJMoa1309533>
- Chen, S.-J., Wang, S.-C., Chen, Y.-C., 2019. Antiviral Agents as Therapeutic Strategies Against Cytomegalovirus Infections. *Viruses* 12, 21. <https://doi.org/10.3390/v12010021>
- Cherrier, L., Nasar, A., Goodlet, K.J., Nailor, M.D., Tokman, S., Chou, S., 2018. Emergence of letemovir resistance in a lung transplant recipient with ganciclovir-resistant cytomegalovirus infection. *Am. J. Transplant.* 18, 3060–3064. <https://doi.org/10.1111/ajt.15135>
- Chou, S., 2020. Advances in the genotypic diagnosis of cytomegalovirus antiviral drug resistance. *Antiviral Res.* 176, 104711. <https://doi.org/10.1016/j.antiviral.2020.104711>
- Chou, S., 2017. A third component of the human cytomegalovirus terminase complex is involved in letemovir resistance. *Antiviral Res.* 148, 1–4. <https://doi.org/10.1016/j.antiviral.2017.10.019>

- Chou, S., 2015. Rapid *In Vitro* Evolution of Human Cytomegalovirus UL56 Mutations That Confer Letermovir Resistance. *Antimicrob. Agents Chemother.* 59, 6588–6593. <https://doi.org/10.1128/AAC.01623-15>
- Chou, S., Lurain, N.S., Thompson, K.D., Miner, R.C., Drew, W.L., 2003. Viral DNA Polymerase Mutations Associated with Drug Resistance in Human Cytomegalovirus. *J. Infect. Dis.* 188, 32–39. <https://doi.org/10.1086/375743>
- Chou, S., Marousek, G.I., 2006. Maribavir Antagonizes the Antiviral Action of Ganciclovir on Human Cytomegalovirus. *Antimicrob. Agents Chemother.* 50, 3470–3472. <https://doi.org/10.1128/AAC.00577-06>
- Chou, S., Satterwhite, L.E., Ercolani, R.J., 2018. New Locus of Drug Resistance in the Human Cytomegalovirus UL56 Gene Revealed by *In Vitro* Exposure to Letermovir and Ganciclovir. *Antimicrob. Agents Chemother.* 62. <https://doi.org/10.1128/AAC.00922-18>
- Chou, S., Song, K., Wu, J., Bo, T., Crumpacker, C., 2020. Drug Resistance Mutations and Associated Phenotypes Detected in Clinical Trials of Maribavir for Treatment of Cytomegalovirus Infection. *J. Infect. Dis.* jiaa462. <https://doi.org/10.1093/infdis/jiaa462>
- Cockrell, S.K., Huffman, J.B., Toropova, K., Conway, J.F., Homa, F.L., 2011. Residues of the UL25 Protein of Herpes Simplex Virus That Are Required for Its Stable Interaction with Capsids. *J. Virol.* 85, 4875–4887. <https://doi.org/10.1128/JVI.00242-11>
- Coste-Mazeau, P., Alain, S., Muller, C., Andouard, D., Hantz, S., 2021. Infection de la femme enceinte par le cytomégalo­virus : du dépistage au traitement 10.
- Couvreux, A., Hantz, S., Marquant, R., Champier, G., Alain, S., Morellet, N., Bouaziz, S., 2010. Insight into the structure of the pUL89 C-terminal domain of the human cytomegalovirus terminase complex. *Proteins Struct. Funct. Bioinforma.* NA-NA. <https://doi.org/10.1002/prot.22669>
- Crumpacker, C.S., 1992. Mechanism of action of foscarnet against viral polymerases. *Am. J. Med.* 92, S3–S7. [https://doi.org/10.1016/0002-9343\(92\)90329-A](https://doi.org/10.1016/0002-9343(92)90329-A)
- Dai, X., Gong, D., Lim, H., Jih, J., Wu, T.-T., Sun, R., Zhou, Z.H., 2018. Structure and mutagenesis reveal essential capsid protein interactions for KSHV replication. *Nature* 553, 521–525. <https://doi.org/10.1038/nature25438>
- Davison, A.J., 1992. Channel catfish virus: A new type of herpesvirus. *Virology* 186, 9–14. [https://doi.org/10.1016/0042-6822\(92\)90056-U](https://doi.org/10.1016/0042-6822(92)90056-U)
- Deayton, J.R., Sabin, C.A., Johnson, M.A., Emery, V.C., Wilson, P., Griffiths, P.D., 2004. Importance of cytomegalovirus viraemia in risk of disease progression and death in HIV-infected patients receiving highly active antiretroviral therapy. *The Lancet* 363, 2116–2121. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(04\)16500-8](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(04)16500-8)
- DeRussy, B.M., Boland, M.T., Tandon, R., 2016. Human Cytomegalovirus pUL93 Links Nucleocapsid Maturation and Nuclear Egress. *J. Virol.* 90, 7109–7117. <https://doi.org/10.1128/JVI.00728-16>
- DeRussy, B.M., Tandon, R., 2015. Human Cytomegalovirus pUL93 Is Required for Viral Genome Cleavage and Packaging. *J. Virol.* 89, 12221–12225. <https://doi.org/10.1128/JVI.02382-15>
- 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. <https://doi.org/10.1128/JVI.79.23.14660-14667.2005>
- 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. <https://doi.org/10.1016/j.jcv.2006.07.010>
- El Chaer, F., Shah, D.P., Chemaly, R.F., 2016. How I treat resistant cytomegalovirus infection in hematopoietic cell transplantation recipients. *Blood* 128, 2624–2636. <https://doi.org/10.1182/blood-2016-06-688432>
- Elbasani, E., Gabaev, I., Steinbrück, L., Messerle, M., Borst, E., 2014. Analysis of Essential Viral Gene Functions after Highly Efficient Adeno­fection of Cells with Cloned Human Cytomegalovirus Genomes. *Viruses* 6, 354–370. <https://doi.org/10.3390/v6010354>
- El-Qushayri, A.E., Ghozy, S., Abbas, A.S., Dibas, M., Dahy, A., Mahmoud, A.R., Afifi, A.M., El-Khazragy, N., 2021. Hyperimmunoglobulin therapy for the prevention and treatment of

- congenital cytomegalovirus: a systematic review and meta-analysis. *Expert Rev. Anti Infect. Ther.* 19, 661–669. <https://doi.org/10.1080/14787210.2021.1846521>
- Emery, V.C., 2001. Investigation of CMV disease in immunocompromised patients. *J. Clin. Pathol.* 54, 84–88. <https://doi.org/10.1136/jcp.54.2.84>
- Faust, O., Bigman, L., Friedler, A., 2014. A role of disordered domains in regulating protein oligomerization and stability. *Chem Commun* 50, 10797–10800. <https://doi.org/10.1039/C4CC03863K>
- Gentry, B.G., Bogner, E., Drach, J.C., 2019. Targeting the terminase: An important step forward in the treatment and prophylaxis of human cytomegalovirus infections. *Antiviral Res.* 161, 116–124. <https://doi.org/10.1016/j.antiviral.2018.11.005>
- Gerna, G., Lillieri, D., Baldanti, F., 2019. An overview of letermovir: a cytomegalovirus prophylactic option. *Expert Opin. Pharmacother.* 20, 1429–1438. <https://doi.org/10.1080/14656566.2019.1637418>
- Giesen, K., Radsak, K., Bogner, E., 2000. The potential terminase subunit of human cytomegalovirus, pUL56, is translocated into the nucleus by its own nuclear localization signal and interacts with importin α . *J. Gen. Virol.* 81, 2231–2244. <https://doi.org/10.1099/0022-1317-81-9-2231>
- Goldner, T., Hempel, C., Ruebsamen-Schaeff, H., Zimmermann, H., Lischka, P., 2014. Geno- and Phenotypic Characterization of Human Cytomegalovirus Mutants Selected *In Vitro* after Letermovir (AIC246) Exposure. *Antimicrob. Agents Chemother.* 58, 610–613. <https://doi.org/10.1128/AAC.01794-13>
- Goldner, T., Hewlett, G., Ettischer, N., Ruebsamen-Schaeff, H., Zimmermann, H., Lischka, P., 2011. The Novel Anticytomegalovirus Compound AIC246 (Letermovir) Inhibits Human Cytomegalovirus Replication through a Specific Antiviral Mechanism That Involves the Viral Terminase. *J. Virol.* 85, 10884–10893. <https://doi.org/10.1128/JVI.05265-11>
- Green, M.L., Leisenring, W., Xie, H., Mast, T.C., Cui, Y., Sandmaier, B.M., Sorror, M.L., Goyal, S., Özkök, S., Yi, J., Sahoo, F., Kimball, L.E., Jerome, K.R., Marks, M.A., Boeckh, M., 2016. Cytomegalovirus viral load and mortality after haemopoietic stem cell transplantation in the era of pre-emptive therapy: a retrospective cohort study. *Lancet Haematol.* 3, e119–e127. [https://doi.org/10.1016/S2352-3026\(15\)00289-6](https://doi.org/10.1016/S2352-3026(15)00289-6)
- Habault, J., Poyet, J.-L., 2019. Recent Advances in Cell Penetrating Peptide-Based Anticancer Therapies. *Molecules* 24, 927. <https://doi.org/10.3390/molecules24050927>
- Halpern-Cohen, V., Blumberg, E.A., 2022. New Perspectives on Antimicrobial Agents: Maribavir. *Antimicrob. Agents Chemother.* 0, e02405-21. <https://doi.org/10.1128/aac.02405-21>
- Hantz, Boutolleau, 2019. Le cytomégalovirus.
- Hantz, thèse d'université, 2009. Résistance du cytomégalovirus aux antiviraux : de la clinique à la structure, thèse de doctorat, Limoges, Université de Limoges, 2009. Disponible sur <http://aurore.unilim.fr/ori-oai-search/notice/view/unilim-ori-26031>.
- Hirst, J.D., Vieth, M., Skolnick, J., Brooks, C.L., 1996. Predicting leucine zipper structures from sequence. *Protein Eng. Des. Sel.* 9, 657–662. <https://doi.org/10.1093/protein/9.8.657>
- Hirt, B., 1967. Selective extraction of polyoma DNA from infected mouse cell cultures. *J. Mol. Biol.* 26, 365–369. [https://doi.org/10.1016/0022-2836\(67\)90307-5](https://doi.org/10.1016/0022-2836(67)90307-5)
- Ho, M., 2008. The history of cytomegalovirus and its diseases. *Med. Microbiol. Immunol. (Berl.)* 197, 65–73. <https://doi.org/10.1007/s00430-007-0066-x>
- Hodson, E.M., Jones, C.A., Webster, A.C., Strippoli, G.F.M., Barclay, P.G., Kable, K., Vimalachandra, D., Craig, J.C., 2005. Antiviral medications to prevent cytomegalovirus disease and early death in recipients of solid-organ transplants: a systematic review of randomised controlled trials 365, 11.
- Hughes, B.L., Clifton, R.G., Rouse, D.J., Saade, G.R., Dinsmoor, M.J., Reddy, U.M., Pass, R., Allard, D., Mallett, G., Fette, L.M., Gyamfi-Bannerman, C., Varner, M.W., Goodnight, W.H., Tita, A.T.N., Costantine, M.M., Swamy, G.K., Gibbs, R.S., Chien, E.K., Chauhan, S.P., El-Sayed, Y.Y., Casey, B.M., Parry, S., Simhan, H.N., Napolitano, P.G., Macones, G.A., 2021. A Trial of Hyperimmune Globulin to Prevent Congenital Cytomegalovirus Infection. *N. Engl. J. Med.* 385, 436–444. <https://doi.org/10.1056/NEJMoa1913569>
- Hwang, J.-S., Bogner, E., 2002. ATPase Activity of the Terminase Subunit pUL56 of Human Cytomegalovirus. *J. Biol. Chem.* 277, 6943–6948. <https://doi.org/10.1074/jbc.M108984200>

- Hyde, T.B., Schmid, D.S., Cannon, M.J., 2010. Cytomegalovirus seroconversion rates and risk factors: implications for congenital CMV: CMV seroconversion. *Rev. Med. Virol.* 20, 311–326. <https://doi.org/10.1002/rmv.659>
- Jagot-Lacoussiere, L., Kotula, E., Villoutreix, B.O., Bruzzoni-Giovanelli, H., Poyet, J.-L., 2016. A Cell-Penetrating Peptide Targeting AAC-11 Specifically Induces Cancer Cells Death. *Cancer Res.* 76, 5479–5490. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-16-0302>
- Jarvis, D.L., 2009. Baculovirus-insect cell expression systems. *Methods Enzymol.* 463, 191–222. [https://doi.org/10.1016/S0076-6879\(09\)63014-7](https://doi.org/10.1016/S0076-6879(09)63014-7)
- Kalejta, R.F., 2008. Tegument Proteins of Human Cytomegalovirus. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 72, 249–265. <https://doi.org/10.1128/MMBR.00040-07>
- Kenneson, A., Cannon, M.J., 2007. Review and meta-analysis of the epidemiology of congenital cytomegalovirus (CMV) infection. *Rev. Med. Virol.* 17, 253–276. <https://doi.org/10.1002/rmv.535>
- Kimberlin, D.W., Jester, P.M., Sánchez, P.J., Ahmed, A., Arav-Boger, R., Michaels, M.G., Ashouri, N., Englund, J.A., Estrada, B., Jacobs, R.F., Romero, J.R., Sood, S.K., Whitworth, M.S., Abzug, M.J., Caserta, M.T., Fowler, S., Lujan-Zilbermann, J., Storch, G.A., DeBiasi, R.L., Han, J.-Y., Palmer, A., Weiner, L.B., Bocchini, J.A., Dennehy, P.H., Finn, A., Griffiths, P.D., Luck, S., Gutierrez, K., Halasa, N., Homans, J., Shane, A.L., Sharland, M., Simonsen, K., Vanchiere, J.A., Woods, C.R., Sabo, D.L., Aban, I., Kuo, H., James, S.H., Prichard, M.N., Griffin, J., Giles, D., Acosta, E.P., Whitley, R.J., 2015. Valganciclovir for Symptomatic Congenital Cytomegalovirus Disease. *N. Engl. J. Med.* 372, 933–943. <https://doi.org/10.1056/NEJMoa1404599>
- Kobiler, O., Drayman, N., Butin-Israeli, V., Oppenheim, A., 2012. Virus strategies for passing the nuclear envelope barrier. *Nucleus* 3, 526–539. <https://doi.org/10.4161/nucl.21979>
- Köppen-Rung, P., Dittmer, A., Bogner, E., 2016. Intracellular Distribution of Capsid-Associated pUL77 of Human Cytomegalovirus and Interactions with Packaging Proteins and pUL93. *J. Virol.* 90, 5876–5885. <https://doi.org/10.1128/JVI.00351-16>
- Koszalka, G.W., Johnson, N.W., Good, S.S., Boyd, L., Chamberlain, S.C., Townsend, L.B., Drach, J.C., Biron, K.K., 2002. Preclinical and Toxicology Studies of 1263W94, a Potent and Selective Inhibitor of Human Cytomegalovirus Replication. *Antimicrob. Agents Chemother.* 46, 2373–2380. <https://doi.org/10.1128/AAC.46.8.2373-2380.2002>
- Kotton, C.N., Kumar, D., Caliendo, A.M., Åsberg, A., Chou, S., Snyderman, D.R., Allen, U., Humar, A., 2010. International Consensus Guidelines on the Management of Cytomegalovirus in Solid Organ Transplantation. *Transplantation* 89, 779–795. <https://doi.org/10.1097/TP.0b013e3181cee42f>
- Kotton, C.N., Kumar, D., Caliendo, A.M., Huprikar, S., Chou, S., Danziger-Isakov, L., Humar, A., 2018. The Third International Consensus Guidelines on the Management of Cytomegalovirus in Solid-organ Transplantation. *Transplantation* 102, 900–931. <https://doi.org/10.1097/TP.0000000000002191>
- Krishna, B.A., Wills, M.R., Sinclair, J.H., 2019. Advances in the treatment of cytomegalovirus. *Br. Med. Bull.* 131, 5–17. <https://doi.org/10.1093/bmb/ldz031>
- Krosky, P.M., Baek, M.-C., Coen, D.M., 2003. The Human Cytomegalovirus UL97 Protein Kinase, an Antiviral Drug Target, Is Required at the Stage of Nuclear Egress. *J. Virol.* 77, 905–914. <https://doi.org/10.1128/JVI.77.2.905-914.2003>
- Krosky, P.M., Underwood, M.R., Turk, S.R., Feng, K.W.-H., Jain, R.K., Ptak, R.G., Westerman, A.C., Biron, K.K., Townsend, L.B., Drach, J.C., 1998. Resistance of Human Cytomegalovirus to Benzimidazole Ribonucleosides Maps to Two Open Reading Frames: UL89 and UL56. *J. Virol.* 72, 4721–4728. <https://doi.org/10.1128/JVI.72.6.4721-4728.1998>
- Laemmli, U.K., 1970. Cleavage of Structural Proteins during the Assembly of the Head of Bacteriophage T4. *Nature* 227, 680–685. <https://doi.org/10.1038/227680a0>
- Lamberti, C., Weller, S.K., 1998. The Herpes Simplex Virus Type 1 Cleavage/Packaging Protein, UL32, Is Involved in Efficient Localization of Capsids to Replication Compartments. *J. Virol.* 72, 2463–2473. <https://doi.org/10.1128/JVI.72.3.2463-2473.1998>

- Lee, J.H., Agarwal, A., Mahendradas, P., Lee, C.S., Gupta, V., Pavesio, C.E., Agrawal, R., 2017. Viral posterior uveitis. *Surv. Ophthalmol.* 62, 404–445.
<https://doi.org/10.1016/j.survophthal.2016.12.008>
- Leruez-Ville, M., Magny, J.-F., Couderc, S., Pichon, C., Parodi, M., Bussi eres, L., Guilleminot, T., Ghout, I., Ville, Y., 2017. Risk Factors for Congenital Cytomegalovirus Infection Following Primary and Nonprimary Maternal Infection. *Clin. Infect. Dis.* 65, 398–404.
<https://doi.org/10.1093/cid/cix337>
- Leruez-Ville, M., Ville, Y., 2017. Fetal cytomegalovirus infection. *Best Pract. Res. Clin. Obstet. Gynaecol.* 38, 97–107. <https://doi.org/10.1016/j.bpobgyn.2016.10.005>
- Ligat, G., Cazal, R., Hantz, S., Alain, S., 2018. The human cytomegalovirus terminase complex as an antiviral target: a close-up view. *FEMS Microbiol. Rev.* 42, 137–145.
<https://doi.org/10.1093/femsre/fuy004>
- Ligat, G., Couvreur, A., Cazal, R., Alain, S., Hantz, S., 2019. Highlighting of a LAGLIDADG and a Zing Finger Motifs Located in the pUL56 Sequence Crucial for HCMV Replication. *Viruses* 11, 1093. <https://doi.org/10.3390/v11121093>
- Ligat, G., Jacquet, C., Chou, S., Couvreur, A., Alain, S., Hantz, S., 2017. Identification of a short sequence in the HCMV terminase pUL56 essential for interaction with pUL89 subunit. *Sci. Rep.* 7. <https://doi.org/10.1038/s41598-017-09469-7>
- Ligat, G., Muller, C., Alain, S., Hantz, S., 2020. Le complexe terminase, une cible de choix dans le traitement de l'infection   cytomégalovirus humain. *médecine/sciences* 36, 367–375.
<https://doi.org/10.1051/medsci/2020063>
- Ligat, thèse d'université, 2017. Cytomégalovirus humain, mutations de résistance et nouvelles cibles thérapeutiques, thèse de doctorat, Limoges, Université de Limoges, 2017. Disponible sur <http://aurore.unilim.fr/ori-oai-search/notice/view/2017LIMO0046>.
- 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.
<https://doi.org/10.1128/AAC.01596-09>
- 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. <https://doi.org/10.1093/infdis/jiv352>
- Liu, Y.-T., Jih, J., Dai, X., Bi, G.-Q., Zhou, Z.H., 2019. Cryo-EM structures of herpes simplex virus type 1 portal vertex and packaged genome. *Nature* 570, 257–261.
<https://doi.org/10.1038/s41586-019-1248-6>
- Ljungman, P., 2017. Definitions of CMV infection and disease in transplant patients for use in clinical trials 19.
- Lowance, D., Neumayer, H.-H., Legendre, C.M., Squifflet, J.-P., Kovarik, J., Brennan, P.J., Norman, D., Mendez, R., Keating, M.R., Coggon, G.L., Crisp, A., Lee, I.C., 1999. Valacyclovir for the Prevention of Cytomegalovirus Disease after Renal Transplantation. *N. Engl. J. Med.* 340, 1462–1470. <https://doi.org/10.1056/NEJM199905133401903>
- Lurain, N.S., Chou, S., 2010. Antiviral drug resistance of human cytomegalovirus. *Clin. Microbiol. Rev.* 23, 689–712. <https://doi.org/10.1128/CMR.00009-10>
- Maertens, J., Cordonnier, C., Jaksch, P., Poir , X., Uknis, M., Wu, J., Wijatyk, A., Saliba, F., Witzke, O., Villano, S., 2019. Maribavir for Preemptive Treatment of Cytomegalovirus Reactivation. *N. Engl. J. Med.* 381, 1136–1147. <https://doi.org/10.1056/NEJMoa1714656>
- Maertens, J., Logan, A.C., Jang, J., Long, G., Tang, J.-L., Hwang, W.Y.K., Koh, L.P., Chemaly, R., Gerbitz, A., Winkler, J., Yeh, S.-P., Hiemenz, J., Christoph, S., Lee, D.-G., Wang, P.-N., Holler, E., Mielke, S., Akard, L., Yeo, A., Ramachandra, S., Smith, K., Pertel, P., Segal, F., 2020. Phase 2 Study of Anti-Human Cytomegalovirus Monoclonal Antibodies for Prophylaxis in Hematopoietic Cell Transplantation. *Antimicrob. Agents Chemother.* 64.
<https://doi.org/10.1128/AAC.02467-19>
- Marty, F.M., Ljungman, P., Chemaly, R.F., Maertens, J., Dadwal, S.S., Duarte, R.F., Haider, S., Ullmann, A.J., Katayama, Y., Brown, J., Mullane, K.M., Boeckh, M., Blumberg, E.A., Einsele, H., Snyderman, D.R., Kanda, Y., DiNubile, M.J., Teal, V.L., Wan, H., Murata, Y., Kartsonis, N.A., Leavitt, R.Y., Badshah, C., 2017. Letermovir Prophylaxis for

- Cytomegalovirus in Hematopoietic-Cell Transplantation. *N. Engl. J. Med.* 377, 2433–2444. <https://doi.org/10.1056/NEJMoa1706640>
- Mazeron, M.-C., 2002. Cytomégalovirus. 9782842992675, 2842992679.
- McWilliam, H., Li, W., Uludag, M., Squizzato, S., Park, Y.M., Buso, N., Cowley, A.P., Lopez, R., 2013. Analysis Tool Web Services from the EMBL-EBI. *Nucleic Acids Res.* 41, W597–W600. <https://doi.org/10.1093/nar/gkt376>
- Meissner, C.S., Köppen-Rung, P., Dittmer, A., Lapp, S., Bogner, E., 2011. A “Coiled-Coil” Motif Is Important for Oligomerization and DNA Binding Properties of Human Cytomegalovirus Protein UL77. *PLoS ONE* 6, e25115. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0025115>
- Meissner, C.S., Suffner, S., Schauflinger, M., von Einem, J., Bogner, E., 2012. A Leucine Zipper Motif of a Tegument Protein Triggers Final Envelopment of Human Cytomegalovirus. *J. Virol.* 86, 3370–3382. <https://doi.org/10.1128/JVI.06556-11>
- Microbiology by numbers, 2011. *Nat. Rev. Microbiol.* 9, 628–628. <https://doi.org/10.1038/nrmicro2644>
- Mocarski Jr., E.S., 2007. Betaherpes viral genes and their functions, 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.
- Morère, L., Andouard, D., Labrousse, F., Saade, F., Calliste, C.-A., Cotin, S., Aubard, Y., Rawlinson, W.D., Esclaire, F., Hantz, S., Ploy, M.-C., Alain, S., 2015. Ex vivo model of congenital cytomegalovirus infection and new combination therapies. *Placenta* 36, 41–47. <https://doi.org/10.1016/j.placenta.2014.11.003>
- Muller, C., Alain, S., Baumert, T.F., Ligat, G., Hantz, S., 2021a. Structures and Divergent Mechanisms in Capsid Maturation and Stabilization Following Genome Packaging of Human Cytomegalovirus and Herpesviruses. *Life* 11, 150. <https://doi.org/10.3390/life11020150>
- Muller, C., Alain, S., Gourin, C., Baumert, T.F., Ligat, G., Hantz, S., 2021b. New Insights into Human Cytomegalovirus pUL52 Structure. *Viruses* 13, 1638. <https://doi.org/10.3390/v13081638>
- Muller, C., Tilloy, V., Frobert, E., Feghoul, L., Garrigue, I., Lepiller, Q., Mirand, A., Sidorov, E., Hantz, S., Alain, S., 2022. First clinical description of letermovir resistance mutation in cytomegalovirus UL51 gene and potential impact on the terminase complex structure. *Antiviral Res.* 204, 105361. <https://doi.org/10.1016/j.antiviral.2022.105361>
- Nadal, M., Mas, P.J., Blanco, A.G., Arnan, C., Solà, M., Hart, D.J., Coll, M., 2010a. Structure and inhibition of herpesvirus DNA packaging terminase nuclease domain. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 107, 16078–16083. <https://doi.org/10.1073/pnas.1007144107>
- Nadal, M., Mas, P.J., Blanco, A.G., Arnan, C., Solà, M., Hart, D.J., Coll, M., 2010b. Structure and inhibition of herpesvirus DNA packaging terminase nuclease domain. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 107, 16078–16083.
- Nedeljković, N., Krstić, L., Parabucki, S., Begović, R., Lovrić, L., Trifunović, I., 1984. [Cytomegalovirus transmission by fresh blood]. *Bilt. Hematol. Transfuz.* 12, 121–127.
- Neuber, S., Wagner, K., Goldner, T., Lischka, P., Steinbrueck, L., Messerle, M., Borst, E.M., 2017. Mutual Interplay between the Human Cytomegalovirus Terminase Subunits pUL51, pUL56, and pUL89 Promotes Terminase Complex Formation. *J. Virol.* 91. <https://doi.org/10.1128/JVI.02384-16>
- Neuber, S., Wagner, K., Messerle, M., Borst, E.M., 2018. The C-terminal part of the human cytomegalovirus terminase subunit pUL51 is central for terminase complex assembly. *J. Gen. Virol.* 99, 119–134. <https://doi.org/10.1099/jgv.0.000984>
- Nguyen, C., Kamil, J., 2018. Pathogen at the Gates: Human Cytomegalovirus Entry and Cell Tropism. *Viruses* 10, 704. <https://doi.org/10.3390/v10120704>
- Ogawa-Goto, K., Tanaka, K., Gibson, W., Moriishi, E., Miura, Y., Kurata, T., Irie, S., Sata, T., 2003. Microtubule Network Facilitates Nuclear Targeting of Human Cytomegalovirus Capsid. *J. Virol.* 77, 8541–8547. <https://doi.org/10.1128/JVI.77.15.8541-8547.2003>
- Papanicolaou, G.A., Silveira, F.P., Langston, A.A., Pereira, M.R., Avery, R.K., Uknis, M., Wijatyk, A., Wu, J., Boeckh, M., Marty, F.M., Villano, S., 2019. Maribavir for Refractory or Resistant Cytomegalovirus Infections in Hematopoietic-cell or Solid-organ Transplant Recipients: A

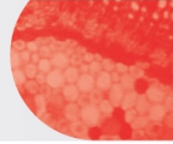
- Randomized, Dose-ranging, Double-blind, Phase 2 Study. *Clin. Infect. Dis.* 68, 1255–1264. <https://doi.org/10.1093/cid/ciy706>
- Pasternak, Y., Ziv, L., Attias, J., Amir, J., Bilavsky, E., 2018. Valganciclovir Is Beneficial in Children with Congenital Cytomegalovirus and Isolated Hearing Loss. *J. Pediatr.* 199, 166–170. <https://doi.org/10.1016/j.jpeds.2018.02.028>
- Pennock, G., Shoemaker, C., Miller, L., 1984. Strong and Regulated Expression of *Escherichia coli* l-Galactosidase in Insect Cells with a Baculovirus Vector 4, 8.
- Pereyra, F., Rubin, R.H., 2004. Prevention and treatment of cytomegalovirus infection in solid organ transplant recipients: *Curr. Opin. Infect. Dis.* 17, 357–361. <https://doi.org/10.1097/01.qco.0000136933.67920.dd>
- Pillet, S., Pozzetto, B., Jarlot, C., Paul, S., Roblin, X., 2012. Management of cytomegalovirus infection in inflammatory bowel diseases. *Dig. Liver Dis.* 44, 541–548. <https://doi.org/10.1016/j.dld.2012.03.018>
- Pillet, S., Roblin, X., Cornillon, J., Mariat, C., Pozzetto, B., 2014. Quantification of cytomegalovirus viral load. *Expert Rev. Anti Infect. Ther.* 12, 193–210. <https://doi.org/10.1586/14787210.2014.870887>
- Piret, J., Boivin, G., 2019. Clinical development of letermovir and maribavir: Overview of human cytomegalovirus drug resistance. *Antiviral Res.* 163, 91–105. <https://doi.org/10.1016/j.antiviral.2019.01.011>
- Plachter, B., Sinzger, C., Jahn, G., 1996. Cell Types Involved in Replication and Distribution of Human Cytomegalovirus, in: *Advances in Virus Research*. Elsevier, pp. 195–261. [https://doi.org/10.1016/S0065-3527\(08\)60073-1](https://doi.org/10.1016/S0065-3527(08)60073-1)
- Plosa, E.J., Esbenschade, J.C., Fuller, M.P., Weitkamp, J.-H., 2012. Cytomegalovirus Infection. *Pediatr. Rev.* 33, 156–163. <https://doi.org/10.1542/pir.33-4-156>
- Poul, M.-A., Cerutti, M., Chaabihi, H., Ticchioni, M., Deramoudt, F.-X., Bernard, A., Devauchelle, G., Kaczorek, M., Lefranc, M.-P., 1995. Cassette baculovirus vectors for the production of chimeric, humanized, or human antibodies in insect cells. *Eur. J. Immunol.* 25, 2005–2009. <https://doi.org/10.1002/eji.1830250731>
- Prichard, M.N., 2009. Function of human cytomegalovirus UL97 kinase in viral infection and its inhibition by maribavir: Human cytomegalovirus UL97 kinase. *Rev. Med. Virol.* 19, 215–229. <https://doi.org/10.1002/rmv.615>
- Reefschlaeger, J., 2001. Novel non-nucleoside inhibitors of cytomegaloviruses (BAY 38-4766): in vitro and in vivo antiviral activity and mechanism of action. *J. Antimicrob. Chemother.* 48, 757–767. <https://doi.org/10.1093/jac/48.6.757>
- Reissmann, S., 2014. Cell penetration: scope and limitations by the application of cell-penetrating peptides: CPPS, TYPES, UPTAKE, TRAFFICKING, SELECTIVITY, AND CLINICAL STUDIES. *J. Pept. Sci.* 20, 760–784. <https://doi.org/10.1002/psc.2672>
- Revello, M.G., Lazzarotto, T., Guerra, B., Spinillo, A., Ferrazzi, E., Kustermann, A., Guaschino, S., Vergani, P., Todros, T., Frusca, T., Arossa, A., Furione, M., Rognoni, V., Rizzo, N., Gabrielli, L., Klersy, C., Gerna, G., 2014. A Randomized Trial of Hyperimmune Globulin to Prevent Congenital Cytomegalovirus. *N. Engl. J. Med.* 370, 1316–1326. <https://doi.org/10.1056/NEJMoa1310214>
- Rigou, P., Piddubnyak, V., Faye, A., Rain, J.-C., Michel, L., Calvo, F., Poyet, J.-L., 2009. The antiapoptotic protein AAC-11 interacts with and regulates Acinus-mediated DNA fragmentation. *EMBO J.* 28, 1576–1588. <https://doi.org/10.1038/emboj.2009.106>
- Robin, C., Hémerly, F., Dindorf, C., Thillard, J., Cabanne, L., Redjoul, R., Beckerich, F., Rodriguez, C., Pautas, C., Toma, A., Maury, S., Durand-Zaleski, I., Cordonnier, C., 2017. Economic burden of preemptive treatment of CMV infection after allogeneic stem cell transplantation: a retrospective study of 208 consecutive patients. *BMC Infect. Dis.* 17, 747. <https://doi.org/10.1186/s12879-017-2854-2>
- Roy, A., Kucukural, A., Zhang, Y., 2010. I-TASSER: a unified platform for automated protein structure and function prediction. *Nat. Protoc.* 5, 725–738. <https://doi.org/10.1038/nprot.2010.5>
- Rubin, R.H., 2000. Prevention of cytomegalovirus infection in organ transplant recipients. *Transpl. Infect. Dis.* 2, 99–100. <https://doi.org/10.1034/j.1399-3062.2000.020301.x>

- Savva, C.G.W., Holzenburg, A., Bogner, E., 2004. Insights into the structure of human cytomegalovirus large terminase subunit pUL56. *FEBS Lett.* 563, 135–140. [https://doi.org/10.1016/S0014-5793\(04\)00283-2](https://doi.org/10.1016/S0014-5793(04)00283-2)
- Scheffczyk, H., 2002. The terminase subunits pUL56 and pUL89 of human cytomegalovirus are DNA-metabolizing proteins with toroidal structure. *Nucleic Acids Res.* 30, 1695–1703. <https://doi.org/10.1093/nar/30.7.1695>
- Scholz, B., 2003. Identification of the ATP-binding site in the terminase subunit pUL56 of human cytomegalovirus. *Nucleic Acids Res.* 31, 1426–1433. <https://doi.org/10.1093/nar/gkg229>
- Sénéchal, B., 1998. Réactivation du cytomégalovirus humain après stimulation allogénique des cellules mononucléées du sang périphérique de donneurs sains. *Virologie* 2.
- Sievers, F., Wilm, A., Dineen, D., Gibson, T.J., Karplus, K., Li, W., Lopez, R., McWilliam, H., Remmert, M., Söding, J., Thompson, J.D., Higgins, D.G., 2011. Fast, scalable generation of high-quality protein multiple sequence alignments using Clustal Omega. *Mol. Syst. Biol.* 7, 539. <https://doi.org/10.1038/msb.2011.75>
- Sinzger, C., Grefte, A., Plachter, B., Gouw, A.S.H., The, T.H., Jahn, G., 1995. Fibroblasts, epithelial cells, endothelial cells and smooth muscle cells are major targets of human cytomegalovirus infection in lung and gastrointestinal tissues. *J. Gen. Virol.* 76, 741–750. <https://doi.org/10.1099/0022-1317-76-4-741>
- Smith, G.E., Fraser, M.J., Summers, M.D., 1983. Molecular Engineering of the *Autographa californica* Nuclear Polyhedrosis Virus Genome: Deletion Mutations Within the Polyhedrin Gene. *J. Virol.* 46, 584–593. <https://doi.org/10.1128/jvi.46.2.584-593.1983>
- Snydman, D.R., 2001. Historical overview of the use of cytomegalovirus hyperimmune globulin in organ transplantation. *Transpl. Infect. Dis.* 3, 6–13. <https://doi.org/10.1034/j.1399-3062.2001.00002.x>
- Summers, M.D., 1987. A manual of methods for baculovirus vectors and insect cell culture procedures.
- Sun, J., Liu, C., Peng, R., Zhang, F.-K., Tong, Z., Liu, S., Shi, Y., Zhao, Z., Zeng, W.-B., Gao, G.F., Shen, H.-J., Yang, X., Luo, M., Qi, J., Wang, P., 2020. Cryo-EM structure of the varicella-zoster virus A-capsid. *Nat. Commun.* 11, 4795. <https://doi.org/10.1038/s41467-020-18537-y>
- Tandon, R., Mocarski, E.S., Conway, J.F., 2015. The A, B, Cs of Herpesvirus Capsids. *Viruses* 7, 899–914. <https://doi.org/10.3390/v7030899>
- Tengelsen, L.A., Pederson, N.E., Shaver, P.R., Wathen, M.W., Homa, F.L., 1993. Herpes simplex virus type 1 DNA cleavage and encapsidation require the product of the UL28 gene: isolation and characterization of two UL28 deletion mutants. *J. Virol.* 67, 3470–3480. <https://doi.org/10.1128/jvi.67.6.3470-3480.1993>
- Theiß, J., Sung, M.W., Holzenburg, A., Bogner, E., 2019. Full-length human cytomegalovirus terminase pUL89 adopts a two-domain structure specific for DNA packaging. *PLOS Pathog.* 15, e1008175. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1008175>
- Thoma, C., Borst, E., Messerle, M., Rieger, M., Hwang, J.-S., Bogner, E., 2006. Identification of the Interaction Domain of the Small Terminase Subunit pUL89 with the Large Subunit pUL56 of Human Cytomegalovirus †. *Biochemistry* 45, 8855–8863. <https://doi.org/10.1021/bi0600796>
- Tomtishen III, J.P., 2012. Human cytomegalovirus tegument proteins (pp65, pp71, pp150, pp28). *Virol. J.* 9, 22. <https://doi.org/10.1186/1743-422X-9-22>
- Townsend, L.B., Devivar, R.V., Turk, S.R., Nassiri, M.R., Drach, J.C., 1995. Design, synthesis, and antiviral activity of certain 2,5,6-trihalo-1-(beta-D-ribofuranosyl)benzimidazoles. *J. Med. Chem.* 38, 4098–4105. <https://doi.org/10.1021/jm00020a025>
- Underwood, M.R., Ferris, R.G., Sellese, D.W., Davis, M.G., Drach, J.C., Townsend, L.B., Biron, K.K., Boyd, F.L., 2004. Mechanism of Action of the Ribopyranoside Benzimidazole GW275175X against Human Cytomegalovirus. *Antimicrob. Agents Chemother.* 48, 1647–1651. <https://doi.org/10.1128/AAC.48.5.1647-1651.2004>
- Underwood, M.R., Harvey, R.J., Stanat, S.C., Hemphill, M.L., Miller, T., Drach, J.C., Townsend, L.B., Biron, K.K., 1998. Inhibition of Human Cytomegalovirus DNA Maturation by a Benzimidazole Ribonucleoside Is Mediated through the UL89 Gene Product. *J. Virol.* 72, 717–725. <https://doi.org/10.1128/JVI.72.1.717-725.1998>

- van Oers, M.M., 2011. Opportunities and challenges for the baculovirus expression system. *J. Invertebr. Pathol.* 107, S3–S15. <https://doi.org/10.1016/j.jip.2011.05.001>
- Vaughn, J.L., Goodwin, R.H., Tompkins, G.J., McCawley, P., 1977. The establishment of two cell lines from the insect *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera: Noctuidae).
- Veit, T., Munker, D., Kauke, T., Zoller, M., Michel, S., Ceelen, F., Schiopu, S., Barton, J., Arnold, P., Milger, K., Behr, J., Kneidinger, N., 2020. Letemovir for Difficult to Treat Cytomegalovirus Infection in Lung Transplant Recipients. *Transplantation* 104, 410–414. <https://doi.org/10.1097/TP.0000000000002886>
- Viral Zone, 2022. Human viruses table [WWW Document]. URL <https://viralzone.expasy.org/678> (accessed 7.26.22).
- Walmsley, S.L., Chew, E., Read, S.E., Vellend, H., Salit, I., Rachlis, A., Fanning, M.M., 1988. Treatment of Cytomegalovirus Retinitis with Trisodium Phosphonoformate Hexahydrate (Foscarnet). *J. Infect. Dis.* 157, 569–572. <https://doi.org/10.1093/infdis/157.3.569>
- Wang, D., Shenk, T., 2005. Human cytomegalovirus virion protein complex required for epithelial and endothelial cell tropism. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 102, 18153–18158. <https://doi.org/10.1073/pnas.0509201102>
- Wang, J.B., Zhu, Y., McVoy, M.A., Parris, D.S., 2012. Changes in subcellular localization reveal interactions between human cytomegalovirus terminase subunits. *Virol. J.* 9. <https://doi.org/10.1186/1743-422X-9-315>
- Wang, N., Chen, W., Zhu, L., Zhu, D., Feng, R., Wang, J., Zhu, B., Zhang, X., Chen, X., Liu, X., Yan, R., Ni, D., Zhou, G.G., Liu, H., Rao, Z., Wang, X., 2020. Structures of the portal vertex reveal essential protein-protein interactions for Herpesvirus assembly and maturation. *Protein Cell* 11, 366–373. <https://doi.org/10.1007/s13238-020-00711-z>
- Wang, Y., Mao, L., Kankanala, J., Wang, Z., Geraghty, R.J., 2017. Inhibition of Human Cytomegalovirus pUL89 Terminase Subunit Blocks Virus Replication and Genome Cleavage. *J. Virol.* 91, e02152-16. <https://doi.org/10.1128/JVI.02152-16>
- Wang, Y., Tang, J., Wang, Z., Geraghty, R.J., 2018. Metal-chelating 3-hydroxypyrimidine-2,4-diones inhibit human cytomegalovirus pUL89 endonuclease activity and virus replication. *Antiviral Res.* 152, 10–17. <https://doi.org/10.1016/j.antiviral.2018.01.015>
- Williams, S.L., Hartline, C.B., Kushner, N.L., Harden, E.A., Bidanset, D.J., Drach, J.C., Townsend, L.B., Underwood, M.R., Biron, K.K., Kern, E.R., 2003. In Vitro Activities of Benzimidazole D- and L-Ribonucleosides against Herpesviruses. *Antimicrob. Agents Chemother.* 47, 2186–2192. <https://doi.org/10.1128/AAC.47.7.2186-2192.2003>
- Yang, J., Yan, R., Roy, A., Xu, D., Poisson, J., Zhang, Y., 2015. The I-TASSER Suite: protein structure and function prediction. *Nat. Methods* 12, 7–8. <https://doi.org/10.1038/nmeth.3213>
- Yang, J., Zhang, Y., 2015. I-TASSER server: new development for protein structure and function predictions. *Nucleic Acids Res.* 43, W174–W181. <https://doi.org/10.1093/nar/gkv342>
- Yang, Y., Yang, P., Wang, N., Chen, Z., Su, D., Zhou, Z.H., Rao, Z., Wang, X., 2020. Architecture of the herpesvirus genome-packaging complex and implications for DNA translocation. *Protein Cell* 11, 339–351. <https://doi.org/10.1007/s13238-020-00710-0>
- Yu, X., Jih, J., Jiang, J., Zhou, Z.H., 2017. Atomic structure of the human cytomegalovirus capsid with its securing tegument layer of pp150. *Science* 356. <https://doi.org/10.1126/science.aam6892>
- Zuhair, M., Smit, G.S.A., Wallis, G., Jabbar, F., Smith, C., Devleeschauwer, B., Griffiths, P., 2019. Estimation of the worldwide seroprevalence of cytomegalovirus: A systematic review and meta-analysis. *Rev. Med. Virol.* 29, e2034. <https://doi.org/10.1002/rmv.2034>

ANNEXES

Annexe 1. Revue : Infection de la femme enceinte par le cytomegalovirus ; du dépistage au traitement	208
Annexe 2. Revue: Structure and divergent mechanisms in capsid maturation and stabilization following genome packaging of human cytomegalovirus and herpesviruses	218
Annexe 3. Revue : Le complexe terminase, une cible de choix dans le traitement de l'infection à cytomegalovirus humain.....	234
Annexe 4. Article : Potentiel of anti-CMV immunoglobulin cytotect CP® <i>in vitro</i> and <i>ex vivo</i> in a first trimester placenta model	244
Annexe 5. Génération des inserts UL56 et UL89 pour la production de protéines recombinantes.....	260
Annexe 6. Protocole de purification sur billes magnétiques Ni-NTA.....	262
Annexe 7. Réactifs migration, coloration SDS-PAGE et western blot.....	263



Infection de la femme enceinte par le cytomegalovirus : du dépistage au traitement

P. COSTE-MAZEAU^{1,2}, S. ALAIN^{1,3}, C. MULLER¹, D. ANDOUARD¹, S. HANTZ^{1,3}

RÉSUMÉ

L'infection congénitale à cytomegalovirus en lien avec une primo-infection ou une infection secondaire (réinfection/réactivation) est aujourd'hui la première cause de handicap neurosensoriel d'origine infectieuse chez les nouveaux-nés. Chaque année en France, 3 400 enfants naissent infectés par le cytomegalovirus avec un risque de développer des séquelles neuro-développementales graves et une surdité de perception. Le dépistage maternel, lorsqu'il est réalisé, repose sur la détection des anticorps (IgG et IgM) spécifiques et par une mesure de l'avidité des IgG quand des IgM sont décelées. Le diagnostic de l'infection congénitale est établi par la mise en évidence de l'ADN viral (par PCR) lors de la réalisation d'une amniocentèse, complété par la détermination de la virurie de l'enfant à sa naissance. Une prise en charge thérapeutique, en cas de primo-infection maternelle, est proposée dans certains centres et repose sur l'administration d'un antiviral ou d'un anticorps anti-CMV. À ce jour, le seul consensus international s'appuie sur la nécessité d'informer les femmes enceintes des risques inhérents à cette infection virale et de leur prodiguer des conseils d'hygiène préventifs, encore trop souvent méconnus.

MOTS-CLÉS : cytomegalovirus (CMV), grossesse, fœtus, nouveau-né, infection congénitale, surdité.

I - INTRODUCTION

L'Homme est le seul réservoir du cytomegalovirus (CMV), virus de la famille des *Herpesviridae*, et ses voies d'excrétion sont multiples : salive, urines, sperme, sécrétions cervico-vaginales, lait maternel. La grossesse, de par l'immunodépression relative qu'elle induit, est une situation à risque d'infection maternelle, mais également congénitale. En France, environ 3 400 nouveau-nés pour 800 000 naissances annuelles sont infectés par le CMV et risquent une surdité et un retard psychomoteur majeur (1). Ainsi, le CMV est aujourd'hui la première cause de handicap neurosensoriel d'origine infectieuse chez les nouveau-nés. Depuis le rapport de la Haute Autorité de Santé publié en 2004, le dépistage systématique d'une « séroconversion CMV » chez la femme enceinte n'est pas recommandé, car aucun traitement n'a été validé par un essai randomisé pour prévenir l'atteinte fœtale. Cette décision a été réitérée en 2018 par le

Haut Conseil de Santé publique. Cependant, le Collège National des Gynécologues Obstétriciens Français (CNGOF) précise qu'un dépistage des patientes « séronégatives » en début de grossesse, suivi de mesures d'hygiène *ad hoc* diminuent le nombre d'enfants atteints à la naissance : le risque de contamination serait ainsi réduit de l'ordre de 50 à 84 % (2). Toutefois, en l'absence de preuves suffisantes de l'efficacité d'un traitement préventif de la transmission materno-fœtale ou curatif d'un fœtus infecté, le dépistage systématique ne peut être préconisé, précise le CNGOF. L'Académie de médecine s'est, quant à elle, prononcée en faveur du dépistage en 2019.

¹ Centre de Biologie et de Recherche en Santé, UMR Inserm U1092.

² Service de Gynécologie Obstétrique.

³ Laboratoire de Bactériologie-Virologie-Hygiène, CNR des Herpesvirus, CHRU de Limoges.

Auteur correspondant : perrine.coste-mazeau@unilim.fr

II. - DU DÉPISTAGE...

Une infection primaire (primo-infection) par le CMV se manifeste par la synthèse d'IgM et d'IgG spécifiques chez une patiente antérieurement « séronégative », trait biologique définissant une « séroconversion ». À la suite d'une primo-infection, le virus persiste sous une forme latente durant toute la vie, associé à la présence sérique d'IgG (« séropositivité CMV »). Une infection secondaire est consécutive soit à une reprise de la multiplication du virus restée en dormance (réactivation), soit à une nouvelle contamination par une souche virale distincte de celle responsable de la primo-infection (réinfection).

Le dépistage de l'infection congénitale à CMV est proposé dans différents pays d'Europe, en Israël, en Australie et aux États-Unis (E.-U) d'Amérique, indépendamment de programmes nationaux (3). Cependant, son dépistage systématique n'est pas recommandé en raison de l'absence de traitement validé et de la difficulté à prédire les potentielles atteintes fœtales. L'expérience d'Israël fait état d'une augmentation du taux de demande d'interruption médicale de grossesse en cas de dépistage (4). Ainsi, différentes stratégies s'opposent. Certaines préconisent la réalisation itérative d'études sérologiques avec dosage d'anticorps (IgG et IgM) spécifiques du CMV jusqu'à la fin du premier trimestre ou jusqu'à 20 semaines d'aménorrhées (SA) chez les patientes « séronégatives » (5) et d'autres, lors du premier trimestre de la grossesse puis à l'accouchement, et un dépistage sanguin ou urinaire du virus chez un nouveau-né dont la mère est suspectée d'infection. Cette stratégie permettrait le dépistage de 82 % d'infections congénitales (5). Certaines équipes n'effectuent le dépistage qu'en cas de situations obstétricales évocatrices : menace d'accouchement précoce, rupture prématurée des membranes, retard de croissance intra-utérin... Un avis auprès d'un centre pluridisciplinaire de diagnostic prénatal doit systématiquement être envisagé en cas d'infection, primaire ou secondaire, durant la grossesse.

Lorsque le dépistage est pratiqué, il repose sur une analyse sérologique des IgG et IgM anti-CMV. Le taux d'anticorps IgG permet de définir le statut sérologique et de détecter une « séroconversion » chez une femme n'ayant jamais eu de contact antérieur avec le virus. La sensibilité et la spécificité des tests commerciaux de détection des IgG anti-CMV sont élevées, respectivement de 97 à 100 % et de 96 à 100 % (6,7). Cependant, la précision et la spécificité des trousses de diagnostic *in vitro* varient lorsque les valeurs d'IgG sont basses ; ainsi, de faibles taux peuvent être associés à « un vrai positif » ou, au contraire, à « un faux positif » (8). En cas de résultat équivoque, il convient donc de considérer la patiente comme « séronégative », et de fait à risque de primo-infection. Une

étude réalisée en 2012, comparant les cinq tests les plus utilisés actuellement en Europe, a montré que la sensibilité de détection des IgM variait de 80 % à plus de 95 % (6). Si les IgM sont constamment présentes lors d'une primo-infection, leur détection n'est toutefois pas spécifique d'une infection primaire récente, car ces anticorps peuvent persister pendant plusieurs mois, être décelés lors d'une infection secondaire ou par activation polyclonale au cours d'une infection intercurrente, ou enfin être liés à une réactivité croisée des tests. Lorsque des IgM et des IgG sont révélées, il est recommandé de réaliser la mesure de l'avidité des IgG afin d'exclure ou bien de confirmer une infection primaire récente, la précision de datation des tests étant de l'ordre de 3 mois : élevée, elle témoignera d'une infection ancienne et basse, d'une infection récente datant de moins de trois mois. Une valeur équivoque observée lors du premier trimestre de la grossesse ne permettra pas d'éliminer une primo-infection survenue à cette période ou en périconceptionnel. Les tests automatisés d'avidité des IgG ont désormais une sensibilité allant de 82 à 100 % et une spécificité comprise entre 90 et 100 % pour l'identification du stade de l'infection. La concordance entre les différents tests varie de 80 à 100 % (9) ; en cas d'avidité équivoque (« zone grise » de la technique employée), un contrôle par une deuxième technique est donc recommandé par le Haut Conseil de Santé publique. La sensibilité n'est que de 94 % en cas de taux bas d'IgG alors qu'elle est de 100 % quand ils sont hauts (7). Le test d'avidité peut donc être pris en défaut dans le cas d'une séroconversion très récente où le résultat du test serait élevé (10) et dans celui d'une infection ancienne avec de faibles taux d'IgG résiduels où l'avidité serait faible (9).

La détection et la quantification de l'ADN viral dans le sang, la salive ou les urines de la mère peuvent aider à préciser le moment de l'infection. L'absence d'acide nucléique viral dans le sang maternel exclut une primo-infection au cours du mois précédent, avec une sensibilité supérieure à 80 % (11). Cependant, la présence de l'ADN du CMV n'indique pas toujours la survenue d'une infection primaire récente, car l'acide nucléique peut rester détectable sur de longues périodes ou être décelé lors d'une infection secondaire (11). Deux études ont démontré que la persistance d'ADNémie maternelle au moment de l'amniocentèse ou l'augmentation de la charge virale consécutive à une infection primaire par le CMV était corrélée à un risque élevé de sa transmission au fœtus (12) (13). Une autre étude a révélé que la présence d'ADN du virus dans l'urine et dans le sang maternels serait liée à la transmission virale au nouveau-né (14).

Le diagnostic d'une infection secondaire est difficile, car elle est rarement associée à une apparition

d'IgM ou élévation d'IgG dans le sérum (15-17). Dans une cohorte rétrospective rapportée en 2018 (18), 7 des 205 (3,4 %) femmes « séropositives » connues, pour lesquelles des IgM spécifiques avaient été détectées dans leur sérum et de l'ADN du CMV dans leur sang ou leurs urines, ont accouché d'un nouveau-né infecté. Une PCR CMV positive dans le sang, l'urine ou la salive d'une femme connue comme « séropositive » avant la grossesse permettrait ainsi d'aider au diagnostic d'infection secondaire. De plus, distinguer une réinfection d'une réactivation est également difficile, car aucun test différentiel n'est disponible en routine. Seule la recherche d'anticorps dirigés contre les régions variables des glycoprotéines d'enveloppe du virus permet de mettre en évidence une réponse humorale contre une nouvelle souche infectante (19). L'analyse, par séquençage d'ADN à haut débit (*Next-generation sequencing*), des populations virales, circulantes ou excrétées, peut également, en cas de réplication virale, contribuer à l'identification de nouvelles souches.

En cas de suspicion de transmission du CMV, le diagnostic de l'infection fœtale peut être établi après analyse (par PCR) du liquide amniotique prélevé par amniocentèse après 20-21 semaines de grossesse, avec une sensibilité et une spécificité élevées. Il est recommandé de réaliser ce geste invasif (risque de pertes fœtales < 1 %) 8 semaines après la date présumée d'infection, après avoir vérifié l'absence de réplication virale dans le sang maternel (20).

En cas de suspicion de primo-infection ou d'infection secondaire maternelle, ou bien d'infection congénitale présumée ou avérée, il convient de rechercher (par PCR en temps réel) la présence du CMV dans les urines ou la salive de l'enfant à sa naissance, idéalement lors du séjour à la maternité, la sensibilité étant de 100 % dans les urines (21) et de 97 à 100 % dans la salive (22). L'analyse salivaire aurait une valeur prédictive positive de 59 % à 91 % (15, 22), mais cet examen peut être source de faux positifs en cas de charge virale faible (15) : ainsi, en cas de positivité, il doit être confirmé par un test urinaire. Si le prélèvement est réalisé à distance de l'accouchement (au-delà de la troisième semaine de vie), la contamination de l'enfant pourrait résulter d'une contamination postnatale par le lait maternel. Dans cette situation, il peut être proposé, pour préciser le moment de l'infection, d'effectuer une PCR sur le sang séché prélevé au troisième jour de vie dans le cadre du dépistage néonatal des six maladies réalisé aujourd'hui en France chez chaque nouveau-né. Elle détecte, avec une sensibilité de l'ordre de 81 %, la présence du génome viral dans le sang du nouveau-né (23), mais 10 % des enfants infectés ne seraient pas identifiés par cette méthode en raison de leur faible charge virale sanguine (24). Le dépistage néonatal du CMV doit également être proposé en cas

d'anomalies relevées lors de l'examen de l'audition chez les nouveau-nés par otoémissions acoustiques ou potentiels auditifs automatisés et en cas d'hypotrophie < dixième percentile.

III. - AU RISQUE POUR L'ENFANT À NAÎTRE...

La séroprévalence du CMV chez la femme enceinte présente des disparités importantes selon les pays. En France métropolitaine, elle serait de 60 % (15) ; au Brésil de 98 % (25). Ainsi, l'infection par le CMV est devenue la plus fréquente infection congénitale virale dans les pays industrialisés, avec une prévalence estimée entre 0,2 et 6 % à la naissance, et la première cause de perte auditive d'origine non génétique.

La prévalence de la primo-infection à CMV pendant la grossesse est d'environ 1 à 2 % en Europe occidentale et aux E.-U d'Amérique (16, 26). Différents facteurs de primo-infection en cours de grossesse ont été identifiés : le jeune âge maternel, l'emploi de la mère dans une crèche ou son bas niveau socioéconomique. Dans des études menées aux E.-U, 70 % des femmes enceintes « séro-négatives » qui font une primo-infection se contaminent par contact, familial ou professionnel, avec des enfants en bas âge, et 12 à 50 % des femmes ayant des enfants en bas âge à leur domicile ou travaillant dans une collectivité d'enfants s'infectent dans l'année (26, 27).

Selon une méta-analyse de dix études portant sur 2 942 fœtus, le risque de transmission materno-fœtale du CMV après une primo-infection pendant la période pré- et péri-conceptionnelle ainsi qu'au cours des premier, deuxième et troisième trimestres serait respectivement de 5,5 %, 21,0 %, 36,8 %, 40,3 % et 66,2 % (28). À l'instar de la toxoplasmose, les atteintes fœtales seraient moins fréquentes et sévères lorsque la transmission virale surviendrait plus tardivement, décroissant de 28,8 %, 19,3 %, 0,9 et 0,4 % respectivement à la période péri-conceptionnelle, au premier, deuxième et troisième trimestre et, pour l'atteinte auditive de 22,8 % à 0 % entre le premier et le troisième trimestre (28). Dans leur étude rétrospective parue en 2019, Faure-Bardon *et al.* n'ont retrouvé aucune séquelle chez 260 nouveau-nés de mères primo-infectées après le premier trimestre et ont évoqué la possibilité que l'infection à CMV ne soit sévère que durant la période embryonnaire ou très précocement pendant la période fœtale (29). La structure de l'oreille interne se formerait à la dixième semaine et les cellules ciliées sensorielles seraient présentes dès la douzième semaine : une atteinte auditive neurosensorielle ne surviendrait donc qu'après une infection maternelle lors du premier trimestre.

Il est désormais classiquement admis que les infections néonatales sont pour moitié liées à des infections primaires, l'autre moitié à des réactivations/réinfections, mais les données manquent sur ce dernier mode de transmission. Or la morbidité néonatale associée au CMV serait identique, quel que soit le mode de transmission, primaire ou secondaire (30, 31). L'immunité préexistante vis-à-vis du CMV ne protège pas complètement contre la transmission fœtale (32). Les données des pays à forte séroprévalence d'infections à CMV ont révélé que le taux d'infection congénitale dans ces populations est plus élevé que celui observé dans les populations à faible séroprévalence (33), suggérant un rôle important des réinfections. La contribution de l'infection secondaire au poids de l'infection congénitale à CMV n'est pas limitée aux populations à forte prévalence. Dans une étude rétrospective portant sur 1 175 enfants dépistés dans deux maternités parisiennes (61 % de séroprévalence maternelle), près de 50 % des nouveau-nés infectés étaient nés de mères « séropositives » pour le CMV avant la grossesse (15). Le risque de transmission lors d'une infection secondaire est encore incomplètement connu en raison du faible nombre d'études disponibles, dont les deux tiers sont rétrospectives (4, 15, 18) : elle pourrait varier de 1,5 à 12 % (34).

Tous les organes du fœtus peuvent être atteints en cas d'infection congénitale : cœur (épanchement péricardique...), foie (hépatomégalie), rate (splénomégalie), système digestif (hyperéchogénéité intestinale, ascite...), tout comme le placenta (placentomégalie) et le liquide amniotique (oligo ou hydramnios) ; le fœtus peut également parfois présenter un retard de croissance intra-utérin. Cependant, la gravité de l'infection congénitale à CMV est en lien avec l'atteinte du système nerveux central. Les principales anomalies morphologiques cérébrales anténatales sont des ventriculomégalies, des calcifications intracérébrales, des anomalies du corps calleux et de la gyration (Figure 1). L'absence d'anomalie morphologique détectée par échographie ou IRM ne permet pas de prédire l'inexistence d'une atteinte auditive (35-37). En 2017, une nouvelle classification définissant l'infection congénitale et la maladie à CMV a été établie, et elle inclut désormais la perte auditive neuro sensorielle (3) (Figure 2). En 2020, Demmler-Harrison *et al.* ont confirmé, après un suivi durant 18 ans d'enfants dont les mères avaient contracté une infection à CMV pendant leur grossesse, l'importante prévalence de l'atteinte auditive, respectivement chez 74 % et 20 % de ceux nés symptomatiques et asymptomatiques, en lien avec des infections primaires et, dans une moindre mesure, secondaires (38).

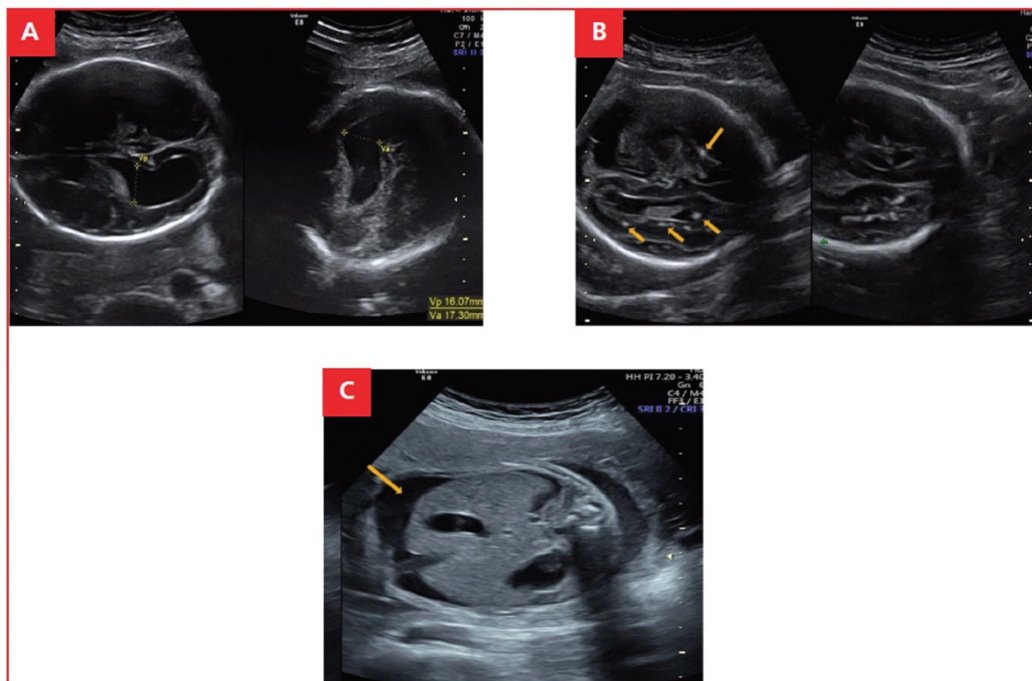


Fig. 1 - Échographie fœtale avec signes évocateurs de fœtopathie causée par le CMV. A, ventriculomégalie bilatérale fœtale ; B, calcifications cérébrales fœtales ; C, ascite fœtale.

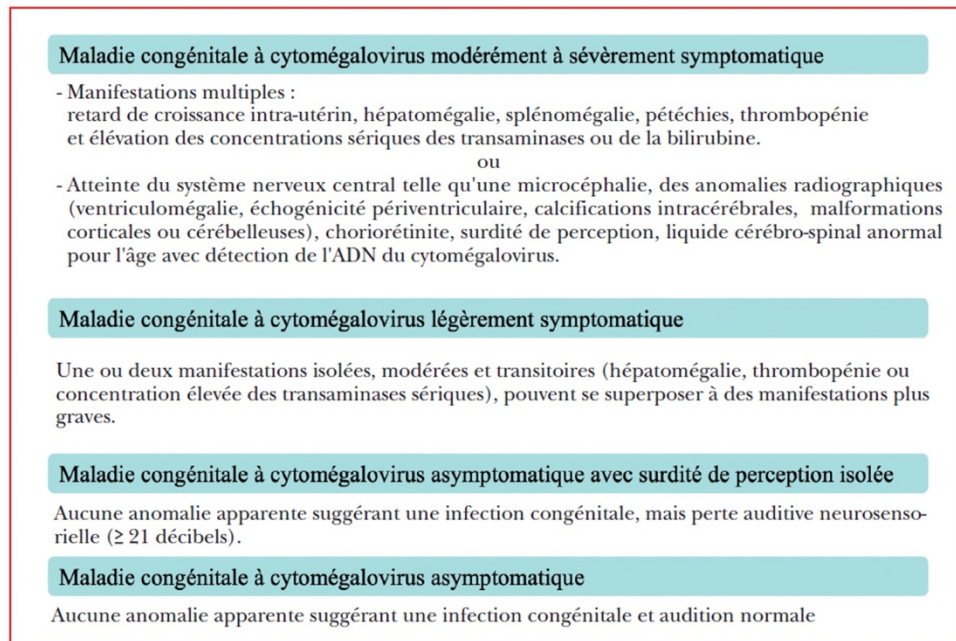


Fig. 2 - Classification de l'infection et de la maladie congénitale à CMV (d'après [3]).

Au total, à la naissance, 10 à 15 % des enfants infectés seront symptomatiques et parmi eux, 3 à 4 % décéderont. La majorité des enfants survivants (40 à 58 %) auront des séquelles développementales ou neurosensorielles conséquentes (surdité profonde, bilatérale...). Parmi les 85 à 90 % d'enfants asymptomatiques à la naissance, 10 à 15 % d'entre eux auront un risque de retard de développement ou de troubles neurosensoriels tels qu'une perte auditive ou des troubles visuels (30).

En l'absence de vaccin anti-CMV, des mesures prévenant la contamination des femmes enceintes, notamment par la salive et les urines des jeunes enfants, peuvent limiter non seulement la primo-infection, mais aussi les réinfections. Des études menées en France et aux E.-U ont montré que moins de 50 % des femmes connaissent le CMV et les moyens de s'en prémunir, mais sous-estiment la gravité de l'infection congénitale (1, 39). En France, plus de 40 % des parents d'enfants en crèches, pourtant à haut risque de contamination, n'ont jamais entendu parler de ce virus (40). Des conseils d'hygiène diffusés au moment de la première consultation de grossesse chez des femmes dépistées « séronégatives » diminueraient d'au moins 50 % le nombre

de « séroconversions » chez les femmes dépistées et informées (41-42). En 2018, le Haut Conseil de Santé publique a émis des recommandations pour la prévention de l'infection à CMV chez la femme enceinte et le nouveau-né par la diffusion large des conseils d'hygiène aux couples (éviter le contact avec la salive, l'urine, les larmes, les sécrétions nasopharyngées ou génitales des enfants ; lavage régulier des mains) et pour les professionnelles de la petite enfance (port de gants, lavage des mains, gel hydroalcoolique).

III. - ET AU TRAITEMENT

Il existe différentes molécules efficaces sur le CMV. Les antiviraux administrés chez les nouveau-nés (valganciclovir) ou chez les receveurs de cellules souches hématopoïétiques (létermovir) n'ont à ce jour pas l'autorisation de mise sur le marché chez les femmes enceintes. Les autres antiviraux utilisés dans la prise en charge des immunodéprimés (ganciclovir, foscarnet et cidofovir) ne peuvent l'être dans ce contexte en raison de leur toxicité. À ce jour, un seul essai randomisé a démontré que le valaciclovir (8 g/j) diminuerait le risque de transmission

materno-fœtale de 30 à 11 % lors d'une primo-infection périconceptionnelle ou au cours du premier trimestre de la grossesse ($p = 0,027$; odds ratio = 0,29 ; 95% CI 0,09-0,90) (43). Une étude multicentrique a révélé, rétrospectivement, que le valaciclovir (8 g/j) administré en cas d'infection congénitale, à partir du moment de son diagnostic jusqu'à l'accouchement, permet d'augmenter la proportion de nouveau-nés asymptomatiques de 43 % à 82 % (44). Aucun effet secondaire indésirable, tant chez les patientes que les fœtus recevant de fortes doses de valaciclovir, n'a été rapporté (44).

Malgré des résultats encourageants constatés lors d'études non randomisées, l'efficacité des immunoglobulines hyperimmunes n'a pas été confirmée dans les deux seules études randomisées publiées à ce jour. L'une d'elles, parue en 2014 (45), a mis en évidence un taux de transmission materno-fœtale du virus de 30 % chez les patientes recevant des immunoglobulines (contre 44 % dans le groupe contrôle ; $p = 0,13$) et a révélé une augmentation, là encore non significative, du risque de survenue d'évènements obstétricaux indésirables (13 % contre 2 %) à type de prématurité (7,6 %), de pré-éclampsie (1,9 %) ou de retard de croissance intra-utérin (3,8 %). Il a été opposé à cet essai thérapeutique une administration de doses d'immunoglobulines trop faibles (100UI/kg), pas assez fréquente (une dose mensuelle) en raison de la demi-vie de 11 jours des immunoglobulines, retardée (médiane d'administration à 5 semaines après le diagnostic de l'infection), et l'inclusion de patientes ayant présenté une primo-infection au deuxième trimestre (46). En 2020, un autre essai clinique randomisé a débuté aux E.U avec les mêmes critères. L'essai, initialement prévu chez 800 patientes, a été interrompu lors d'une analyse intermédiaire (399 inclusions) du fait d'un manque d'efficacité du traitement : 22,7 % de transmission materno-fœtale du virus dans le groupe « immunoglobulines » et 19,4 % dans le groupe « placebo ». Les taux de prématurité n'étaient pas statistiquement différents dans les deux groupes (12,2 % contre 8,3 %) (47). Une très récente étude observationnelle de patientes primo-infectées avant 14 SA, auxquelles étaient administrées dans les trois semaines suivant le diagnostic des immunoglobulines à taux élevé (Cytotect®, 200UI/kg) tous les 15 jours jusqu'à 18 SA, a dévoilé un taux de transmission virale au fœtus significativement ($p < 0,0001$) plus faible que dans un groupe contrôle (7,5 % contre 35,2 %) (49). Une autre étude observationnelle, analogue au plan méthodologique à la précédente, a confirmé ce constat, et l'efficacité des immunoglobulines hyperimmunes, quel que soit le terme de la grossesse (46). Ces deux études récentes n'ont pas constaté de surrisque d'évènements obstétricaux, possiblement en lien avec l'arrêt de l'immunothérapie à 20 SA (48).

IV. - CONCLUSION

La connaissance et la prise en charge de l'infection congénitale à CMV sont un enjeu de santé publique en raison des handicaps sévères possibles des enfants atteints, mais également en raison du coût généré pour la société. Le dépistage précoce d'une surdité par le suivi pédiatrique prolongé en cas d'infection congénitale permet de limiter la répercussion sur le développement de la communication, sur la scolarité et l'insertion sociale ultérieure de l'enfant.

Ainsi, en France, certains préconisent le dépistage systématique de l'infection congénitale pour la mise en place d'un traitement par valaciclovir en cas de primo-infection au premier trimestre de la grossesse, d'autres suggèrent une surveillance rapprochée des fœtus à risque par échographie, IRM et dépistage néonatal ou encore un dépistage qu'en cas de situations obstétricales évocatrices. Ainsi, le CHRU de Limoges (Centre National de Référence des Herpesviridae en collaboration avec le centre pluridisciplinaire de diagnostic anténatal) propose la prise en charge suivante résumée dans les Figures 3 à 6, mais le débat reste ouvert.

Des progrès restent à accomplir dans le dépistage et la caractérisation des infections secondaires, mais également dans la prise en charge thérapeutique qui n'est pas standardisée. Cependant, de nombreux antiviraux ou anticorps anti-CMV, administrés éventuellement en association, laissent entrevoir des perspectives de traitement.

En attendant la preuve définitive de l'efficacité des nombreux vaccins étudiés dans la prévention de l'infection congénitale chez les enfants nés de personnes initialement « séronégatives », les conseils d'hygiène aux femmes enceintes et à la population générale restent la meilleure stratégie de prévention.

CONFLITS D'INTÉRÊTS :

PCM : aucun

SA : déclare être occasionnellement expert scientifique pour GSK, Shire, Sanofi, MSD, Merck, Astra Zeneca, Biotest, BioMérieux, Hologic ; avoir reçu de Biotest, des honoraires pour congrès, frais de voyage et d'hébergement, sans financement personnel. SA a été l'investigateur principal pour la France de l'étude Solstice (Takeda) et est actuellement investigateur principal de deux cohortes académiques : Cohorte Navire, Cohorte BioSupport.

SH : déclare avoir reçu de MSD vaccins des honoraires pour congrès, frais de voyage et d'hébergement, de Diasorin des honoraires pour congrès, de Sanofi des honoraires pour congrès et de Roche Diagnostics une rémunération en tant que conférencier pour les Journées d'experts en virologie.

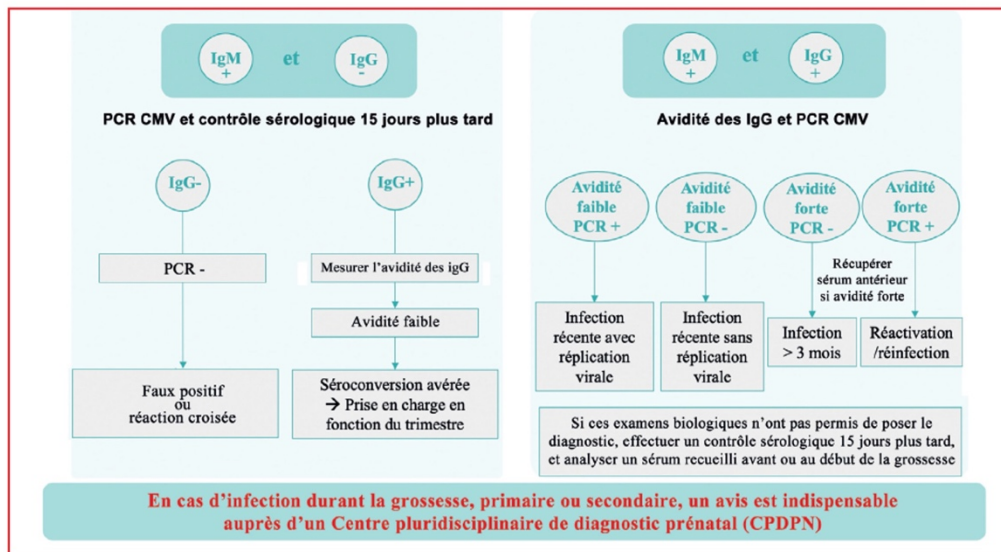


Fig. 3 - Stratégie diagnostique proposée en fonction de l'analyse sérologique maternelle, sans signe échographique et quel que soit le terme de la grossesse.

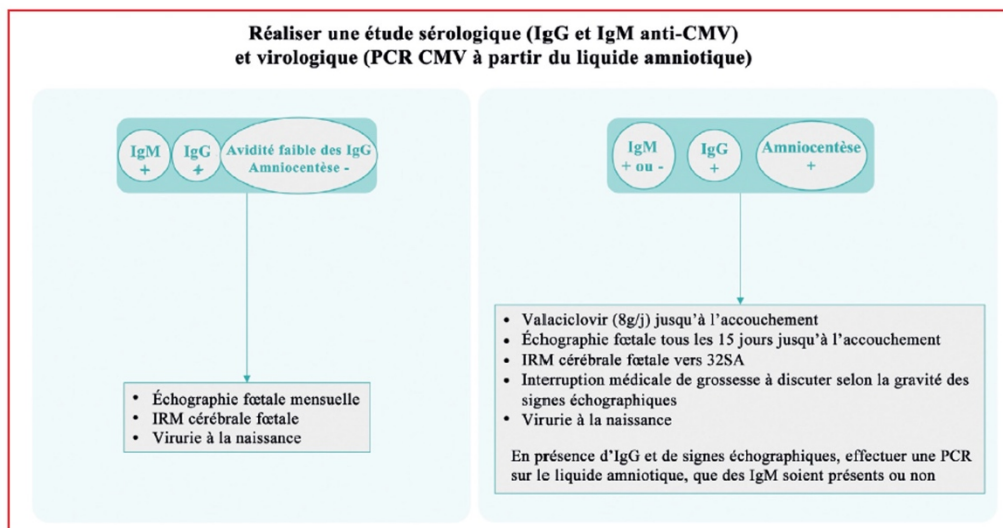


Fig. 4 - Prise en charge médicale proposée par le CNR Herpesvirus (CHRU de Limoges), en présence de signes échographiques évocateurs d'infection congénitale à CMV, quel que soit le terme de la grossesse.

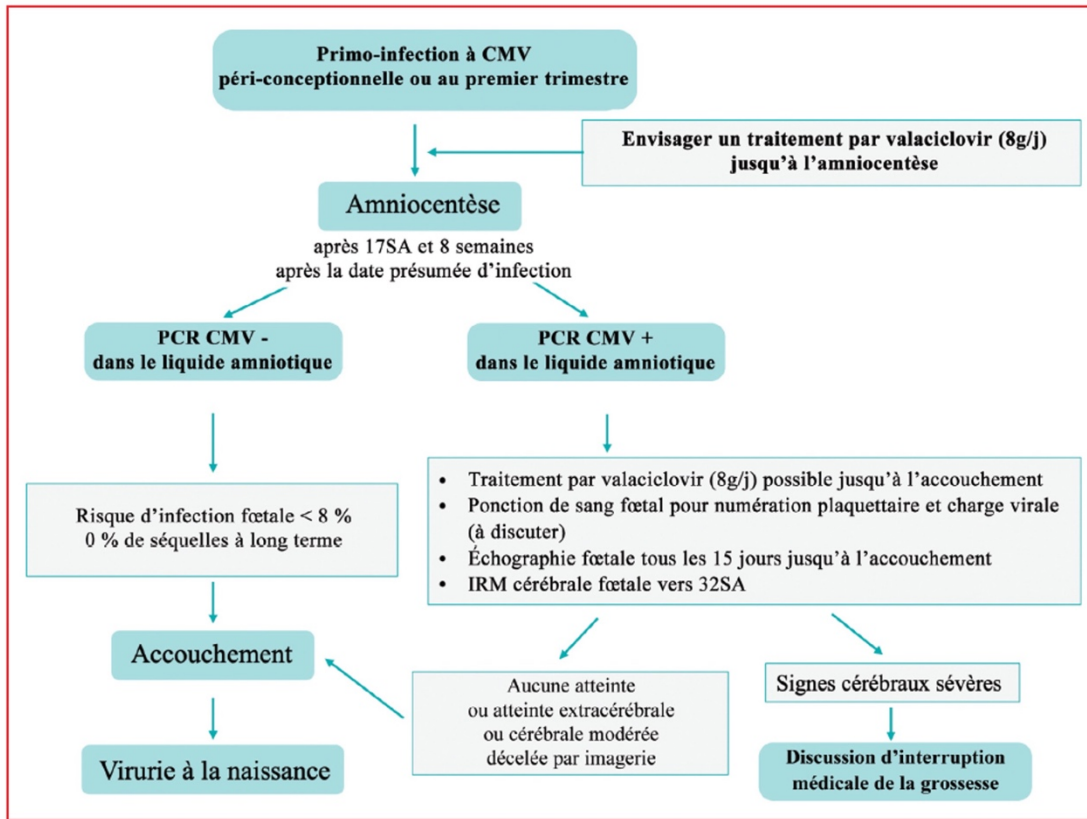


Fig. 5 - Prise en charge médicale proposée par le CNR Herpesvirus (Hôpitaux de Necker et Limoges) en cas de primo-infection au premier trimestre de la grossesse.

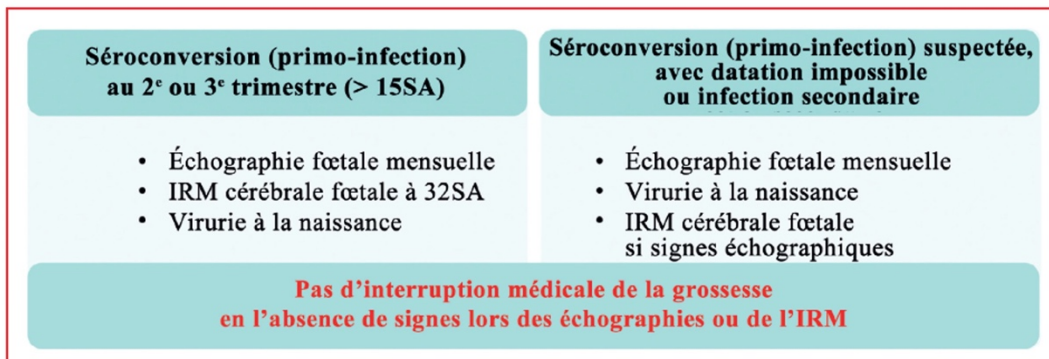


Fig. 6 - Prise en charge médicale proposée par le CNR Herpesvirus (CHRU Limoges) en dehors de la primo-infection au premier trimestre.

RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- (1) Cordier AG, Guittou S, Vauloup-Fellous C, Grangeot-Keros L, Ayoubi JM, Benachi A, *et al.* Awareness of cytomegalovirus infection among pregnant women in France. *J Clin Virol* 2012; 53 (4) : 332-7.
- (2) Adler SP, Finney JW, Manganello AM, Best AM. Prevention of child-to-mother transmission of cytomegalovirus among pregnant women. *J Pediatr* 2004; 145 (4) : 485-91.
- (3) Rawlinson WD, Boppana SB, Fowler KB, Kimberlin DW, Lazzarotto T, Alain S, *et al.* Congenital cytomegalovirus infection in pregnancy and the neonate: consensus recommendations for prevention, diagnosis, and therapy. *Lancet Infect Dis* 2017; 17 (6) : e177-88.
- (4) Rahav G, Gabbay R, Ornoy A, Shechtman S, Arnon J, Diav-Citrin O. Primary versus nonprimary cytomegalovirus infection during pregnancy, Israel. *Emerg Infect Dis* 2007; 13 (11) : 1791-3.
- (5) Lazzarotto T, Blázquez-Gamero D, Delforge ML, Foulon I, Luck S, Modrow S, *et al.* Congenital cytomegalovirus infection: a narrative review of the issues in screening and management from a panel of European experts. *Front Pediatr* 2020; 8 : 13.
- (6) Revello MG, Vauloup-Fellous C, Grangeot-Keros L, van Helden J, Dickstein Y, Lipkin I, *et al.* Clinical evaluation of new automated cytomegalovirus IgM and IgG assays for the Elecsys® analyser platform. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 2012; 31 (12) : 3331-9.
- (7) Rajasekariah H, Scott G, Robertson PW, Rawlinson WD. Improving diagnosis of primary cytomegalovirus infection in pregnant women using immunoblots. *J Med Virol* 2013; 85 (2) : 315-9.
- (8) Furione M, Sarasini A, Arossa A, Fornara C, Lilleri D, Perez L, *et al.* False human cytomegalovirus IgG-positivity at prenatal screening. *J Clin Virol* 2018; 104 : 34-8.
- (9) Sellier Y, Guilleminot T, Ville Y, Leruez-Ville M. Comparison of the LIAISON® CMV IgG Avidity II and the VIDAS® CMV IgG Avidity II assays for the diagnosis of primary infection in pregnant women. *J Clin Virol* 2015; 72 : 46-8.
- (10) Berth M, Grangeot-Keros L, Heskia F, Dugua JM, Vauloup-Fellous C. Analytical issues possibly affecting the performance of commercial human cytomegalovirus IgG avidity assays. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 2014; 33 (9) : 1579-84.
- (11) Revello MG, Furione M, Rognoni V, Arossa A, Gerna G. Cytomegalovirus DNAemia in pregnant women. *J Clin Virol* 2014; 61 (4) : 590-2.
- (12) Zavattoni M, Furione M, Lanzarini P, Arossa A, Rustico M, Tassis B, *et al.* Monitoring of human cytomegalovirus DNAemia during primary infection in transmitter and non-transmitter mothers. *J Clin Virol* 2016; 82 : 89-93.
- (13) Simonazzi G, Cervi F, Zavatta A, Pellizzoni L, Guerra B, Mastroroberto M, *et al.* Congenital cytomegalovirus infection: prognostic value of maternal DNAemia at amniocentesis. *Clin Infect Dis* 2017; 64 (2) : 207-10.
- (14) Delforge ML, Costa E, Brancart F, Goldman D, Montesinos I, Zaytouni S, *et al.* Presence of Cytomegalovirus in urine and blood of pregnant women with primary infection might be associated with fetal infection. *J Clin Virol* 2017; 90 : 14-7.
- (15) Leruez-Ville M, Magny JF, Couderc S, Pichon C, Parodi M, Bussi eres L, *et al.* Risk factors for congenital cytomegalovirus infection following primary and nonprimary maternal infection: a prospective neonatal screening study using polymerase chain reaction in saliva. *Clin Infect Dis* 2017; 65 (3) : 398-404.
- (16) Leruez-Ville M, Foulon I, Pass R, Ville Y. Cytomegalovirus infection during pregnancy: state of the science. *Am J Obstet Gynecol* 2020; 223 (3) : 330-49.
- (17) Picone O, Grangeot-Keros L, Senat M, Fuchs F, Bouthry E, Ayoubi J, *et al.* Cytomegalovirus non-primary infection during pregnancy. Can serology help with diagnosis? *J Matern Fetal Neonatal Med* 2017; 30 (2) : 224-7.
- (18) Simonazzi G, Curti A, Cervi F, Gabrielli L, Contoli M, Capretti MG, *et al.* Perinatal outcomes of non-primary maternal cytomegalovirus infection: a 15-year experience. *Fetal Diagn Ther* 2018; 43 (2) : 138-42.
- (19) Ross SA, Arora N, Novak Z, Fowler KB, Britt WJ, Boppana SB. Cytomegalovirus reinfections in healthy seroimmune women. *J Infect Dis* 2010; 201 (3) : 386-9.
- (20) Enders M, Daiminger A, Exler S, Ertan K, Enders G, Bald R. Prenatal diagnosis of congenital cytomegalovirus infection in 115 cases: a 5 years' single center experience. *Prenat Diagn* 2017; 37 (4) : 389-98.
- (21) de Vries JJ, van der Eijk AA, Wolthers KC, Rusman LG, Pas SD, Molenkamp R, *et al.* Real-time PCR versus viral culture on urine as a gold standard in the diagnosis of congenital cytomegalovirus infection. *J Clin Virol* 2012; 53 (2) : 167-70.
- (22) Boppana SB, Ross SA, Shimamura M, Palmer AL, Ahmed A, Michaels MC, *et al.* Saliva polymerase-chain-reaction assay for cytomegalovirus screening in newborns. *N Engl J Med* 2011; 364 (22) : 2111-8.
- (23) Atkinson C, Emery VC, Griffiths PD. Development of a novel single tube nested PCR for enhanced detection of cytomegalovirus DNA from dried blood spots. *J Virol Methods* 2014; 196 : 40-4.
- (24) Luck SE, Emery VC, Atkinson C, Sharland M, Griffiths PD. Compartmentalized dynamics of cytomegalovirus replication in treated congenital infection. *J Clin Virol* 2016; 82 : 152-8.
- (25) Mussi-Pinhata MM, Yamamoto AY, Aragon DC, Duarte G, Fowler KB, Boppana S, *et al.* Seroconversion for cytomegalovirus infection during pregnancy and fetal infection in a highly seropositive population: « the BraChS study ». *J Infect Dis* 2018; 218 (8) : 1200-4.
- (26) Hyde TB, Schmid DS, Cannon MJ. Cytomegalovirus seroconversion rates and risk factors: implications for congenital CMV. *Rev Med Virol* 2010; 20 (5) : 311-26.
- (27) Adler SP, Nigro G. Prevention of maternal-fetal transmission of cytomegalovirus. *Clin Infect Dis* 2013; 57 (Suppl 4) : S189-92.
- (28) Chatzakis C, Ville Y, Makrydimas G, Dinas K, Zavlanos A, Sotiriadis A. Timing of primary maternal cytomegalovirus infection and rates of vertical transmission and fetal consequences. *Am J Obstet Gynecol* 2020; 223 (6) : 870-83.e11.
- (29) Faure-Bardon V, Magny JF, Parodi M, Couderc S, Garcia P, Maillotte AM, *et al.* Sequelae of congenital cytomegalovirus following maternal primary infections are limited to those acquired in the first trimester of pregnancy. *Clin Infect Dis* 2019; 69 (9) : 1526-32.
- (30) Boppana SB, Fowler KB. Insight into long-term neurodevelopmental outcomes in asymptomatic congenital CMV infection. *Pediatrics* 2017; 140 (5) : e20172526.
- (31) Townsend CL, Forsgren M, Ahlfors K, Ivarsson SA, Tookey PA, Peckham CS. Long-term outcomes of congenital cytomegalovirus infection in Sweden and the United Kingdom. *Clin Infect Dis* 2013; 56 (9) : 1232-9.
- (32) Mussi-Pinhata MM, Yamamoto AY, Moura Brito RM, de Lima Isaac M, de Carvalho e Oliveira PF, Boppana S, *et al.* Birth prevalence and natural history of congenital cytomegalovirus infection in a highly seroimmune population. *Clin Infect Dis* 2009; 49 (4) : 522-8.
- (33) Manicklal S, Emery VC, Lazzarotto T, Boppana SB, Gupta RK. The « silent » global burden of congenital cytomegalovirus. *Clin Microbiol Rev* 2013; 26 (1) : 86-102.

- (34) Mussi-Pinhata MM, Yamamoto AY. Natural history of congenital cytomegalovirus infection in highly seropositive populations. *J Infect Dis* 2020 ; 221 (Suppl 1) : S15-22.
- (35) Faure-Bardon V, Millischer A-E, Deloison B, Sonigo P, Grévent D, Salomon L, *et al*. Refining the prognosis of fetuses infected with *Cytomegalovirus* in the first trimester of pregnancy by serial prenatal assessment: a single-centre retrospective study. *IJOG* 2020 ; 127 (3) : 355-62.
- (36) Picone O, Simon I, Benachi A, Brunelle F, Sonigo P. Comparison between ultrasound and magnetic resonance imaging in assessment of fetal cytomegalovirus infection. *Prenat Diagn* 2008 ; 28 (8) : 753-8.
- (37) Leruez-Ville M, Stirnemann J, Sellier Y, Guillemot T, Dejean A, Magny JF, *et al*. Feasibility of predicting the outcome of fetal infection with cytomegalovirus at the time of prenatal diagnosis. *Am J Obstet Gynecol* 2016 ; 215 (3) : 342.e1-9.
- (38) Demmler-Harrison CJ, Miller JA, Houston Congenital Cytomegalovirus Longitudinal Study Group. Maternal cytomegalovirus immune status and hearing loss outcomes in congenital cytomegalovirus-infected offspring. *PLoS One* 2020 ; 15 (10) : e0240172.
- (39) Cannon MJ. Congenital cytomegalovirus (CMV) epidemiology and awareness. *J Clin Virol* 2009 ; 46 (Suppl 4) : S6-10.
- (40) Alain S, Garnier-Geoffroy F, Labrunie A, Montané A, Marin B, Gatet M, *et al*. Cytomegalovirus (CMV) shedding in French day-care centers: a nationwide study of epidemiology, risk factors, centers' practices, and parents' awareness of CMV. *J Pediatr Infect Dis Soc* 2020 ; 9 (6) : 686-94.
- (41) Revello MC, Tibaldi C, Masuelli G, Frisina V, Sacchi A, Furione M, *et al*. Prevention of primary cytomegalovirus infection in pregnancy. *EBioMedicine* 2015 ; 2 (9) : 1205-10.
- (42) Vauloup-Fellous C, Picone O, Cordier A-G, Parent-du-Châtelet I, Senat MV, Frydman R, *et al*. Does hygiene counseling have an impact on the rate of CMV primary infection during pregnancy? Results of a 3-year prospective study in a French hospital. *J Clin Virol* 2009 ; 46 (Suppl 4) : S49-53.
- (43) Shahr-Nissan K, Pardo J, Peled O, Krause I, Bilavsky E, Wiznitzer A, *et al*. Valaciclovir to prevent vertical transmission of cytomegalovirus after maternal primary infection during pregnancy: a randomised, double-blind, placebo-controlled trial. *Lancet* 2020 ; 396 (10253) : 779-85.
- (44) Leruez-Ville M, Chout I, Bussièrès L, Stirnemann J, Magny JF, Couderc S, *et al*. In utero treatment of congenital cytomegalovirus infection with valacyclovir in a multicenter, open-label, phase II study. *Am J Obstet Gynecol* 2016 ; 215 (4) : 462.e1-10.
- (45) Revello MC, Lazzarotto T, Guerra B, Spinillo A, Ferrazzi E, Kustermann A, *et al*. A randomized trial of hyperimmune globulin to prevent congenital cytomegalovirus. *N Engl J Med* 2014 ; 370 (14) : 1316-26.
- (46) Seidel V, Hackelöer M, Rancourt RC, Henrich W, Siedentopf JP. Fetal and maternal outcome after hyperimmune-globulin administration for prevention of maternal-fetal transmission of cytomegalovirus during pregnancy: retrospective cohort analysis. *Arch Gynecol Obstet* 2020 ; 302 (6) : 1353-9.
- (47) Hughes BL. Randomized trial to prevent congenital cytomegalovirus. *Open Forum Infect Dis* 2019 ; 6 (Suppl 2) : S1000-1.
- (48) Kagan KO, Enders M, Hoopmann M, Geipel A, Simonini C, Berg C, *et al*. Outcome of pregnancies with recent primary cytomegalovirus infection in first trimester treated with hyperimmunoglobulin: observational study. *Ultrasound Obstet Gynecol* 2021 ; 57 (4) : 560-7.
49. Kagan KO, Enders M, Schampera MS, Baeumel E, Hoopmann M, Geipel A, *et al*. Prevention of maternal-fetal transmission of cytomegalovirus after primary maternal infection in the first trimester by biweekly hyperimmunoglobulin administration. *Ultrasound Obstet Gynecol* 2019 ; 53 (3) : 383-9.

Annexe 2. Revue: Structure and divergent mechanisms in capsid maturation and stabilization following genome packaging of human cytomegalovirus and herpesviruses



Review

Structures and Divergent Mechanisms in Capsid Maturation and Stabilization Following Genome Packaging of Human Cytomegalovirus and Herpesviruses

Clotilde Muller ¹, Sophie Alain ^{1,2}, Thomas F. Baumert ^{3,4}, Gaëtan Ligat ^{3,*} and Sébastien Hantz ^{1,2,*}

¹ INSERM, CHU Limoges, University of Limoges, RESINFIT, U1092, 87000 Limoges, France; clotilde.muller@unilim.fr (C.M.); sophie.alain@unilim.fr (S.A.)

² CHU Limoges, Laboratoire de Bactériologie-Virologie-Hygiène, National Reference Center for Herpesviruses (NRCHV), 87000 Limoges, France

³ Institut de Recherche sur les Maladies Virales et Hépatiques, Université de Strasbourg, 67000 Strasbourg, France; Thomas.Baumert@unistra.fr

⁴ Institut Hospitalo-Universitaire, Pôle Hépato-digestif, Nouvel Hôpital Civil, 67000 Strasbourg, France

* Correspondence: gligat@unistra.fr (G.L.); sebastien.hantz@unilim.fr (S.H.)

† These authors contributed equally.

Abstract: Herpesviruses are the causative agents of several diseases. Infections are generally mild or asymptomatic in immunocompetent individuals. In contrast, herpesvirus infections continue to contribute to significant morbidity and mortality in immunocompromised patients. Few drugs are available for the treatment of human herpesvirus infections, mainly targeting the viral DNA polymerase. Moreover, no successful therapeutic options are available for the Epstein–Barr virus or human herpesvirus 8. Most licensed drugs share the same mechanism of action of targeting the viral polymerase and thus blocking DNA polymerization. Resistances to antiviral drugs have been observed for human cytomegalovirus, herpes simplex virus and varicella-zoster virus. A new terminase inhibitor, letermovir, recently proved effective against human cytomegalovirus. However, the letermovir has no significant activity against other herpesviruses. New antivirals targeting other replication steps, such as capsid maturation or DNA packaging, and inducing fewer adverse effects are therefore needed. Targeting capsid assembly or DNA packaging provides additional options for the development of new drugs. In this review, we summarize recent findings on capsid assembly and DNA packaging. We also described what is known about the structure and function of capsid and terminase proteins to identify novel targets for the development of new therapeutic options.

Keywords: herpesviruses; human cytomegalovirus; capsid maturation; DNA packaging; therapeutic targets



Citation: Muller, C.; Alain, S.; Baumert, T.F.; Ligat, G.; Hantz, S. Structures and Divergent Mechanisms in Capsid Maturation and Stabilization Following Genome Packaging of Human Cytomegalovirus and Herpesviruses. *Life* **2021**, *11*, 150. <https://doi.org/10.3390/life11020150>

Academic Editor: Adam Taylor
Received: 18 December 2020
Accepted: 12 February 2021
Published: 16 February 2021

Publisher's Note: MDPI stays neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.



Copyright: © 2021 by the authors. Licensee MDPI, Basel, Switzerland. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (<https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

1. Introduction

Human herpesviruses are large and structurally complex viruses divided into three subfamilies: *Alphaherpesvirinae* such as herpes simplex virus types 1 and 2 (HSV-1 and -2) and varicella-zoster virus (VZV); *Betaherpesvirinae* such as human cytomegalovirus (HCMV) and human herpesvirus types 6A, B and 7 (HHV-6A, -6B and -7); and *Gammapherpesvirinae* such as EBV (Epstein–Barr virus) and human herpesvirus 8 (HHV-8). They are responsible for a wide variety of pathologies ranging from simple localized lesions to disseminated damages. The severity of the clinical forms and the extension of the lesions are closely linked to the immunosuppressive state of the patients. Alphaherpesviruses cause a variety of diseases ranging from cutaneo-mucosal vesicles to encephalitis or disseminated infections. Betaherpesvirus primary infections are often asymptomatic in immunocompetent patients, but viral reactivation can lead to life-threatening complications in immunocompromised individuals. For instance, HCMV is responsible for severe diseases in immunocompromised

patients. Moreover, HCMV is the most common infectious cause of congenital malformations, with developmental delay, sensorineural hearing loss and fetal death in 10–15% of cases [1]. Gammaherpesvirus primary infections are also often mildly symptomatic, except for infectious mononucleosis, but EBV can induce lymphoproliferative disorders, and HHV-8 Kaposi sarcoma.

The approved treatment for HSV-1 and HSV-2 infections is acyclovir. Ganciclovir, valganciclovir, cidofovir and foscarnet are used for the treatment of HCMV infections. These licensed molecules share the same mechanism of action of targeting the viral DNA polymerase. Limitations of these drugs are their dose-limiting toxicity and resistance emergence, leading to therapeutic challenges [2–4]. Letermovir (AIC246) has recently been shown to be effective against HCMV infections. It is indicated for the prophylaxis of HCMV reactivation and HCMV disease in HCMV-positive adults receiving allogeneic hematopoietic stem cell transplantation. However, this new drug has no significant activity against other herpesviruses or nonhuman CMV, and resistance mutations have already emerged [5,6]. Letermovir acts via a novel, not fully understood mechanism. This drug inhibits the cleavage of viral DNA concatemers and the formation of mature HCMV virions by targeting the pUL56 subunit of the viral terminase complex [5,6]. Mutations associated with letermovir resistance map mainly to pUL56. To date, no clinical treatment is available for EBV or HHV-6, -7 and -8.

The infection cycle of HCMV, as for other *Herpesviridae*, comprises various steps in the cell nucleus where genome replication and the assembly of capsids take place. The replication of the 230 kbp DNA genome is thought to occur by a rolling circle process and results in the formation of concatemers that are cleaved into unit-length genomes and packaged into a preformed capsid (Figure 1). The capsid assembly and DNA packaging are crucial steps for herpesvirus multiplication involving various viral proteins. Importantly, these steps are highly specific to the herpesvirus family, have no counterpart in the human organism and thus represent a target of choice for the development of new antivirals.

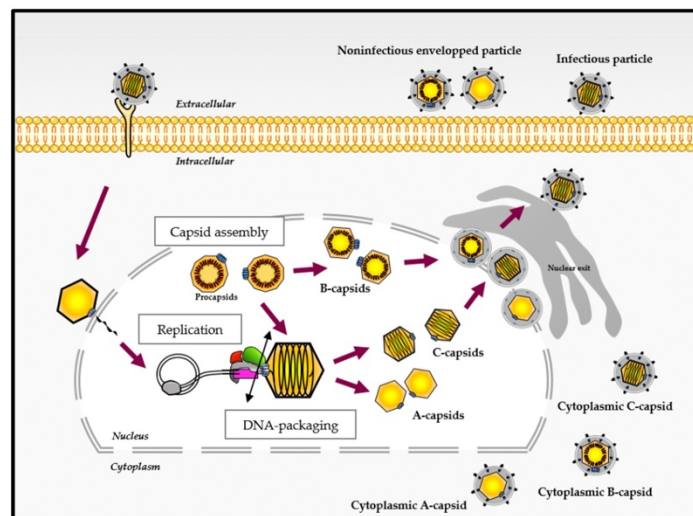


Figure 1. Different virus-like particles during the viral cycle of herpesviruses (adapted from [5,6]). After binding and entry into the host cell, the capsid is transported to the nuclear pore and delivers viral DNA into the nucleus. After genome replication, the DNA packaging step occurs and ends with the cleavage of the concatemers (represented by the double-ended black arrow), releasing viral DNA into the capsid. Different capsid forms are present in the host cell nucleus during infection. These capsid forms, referred to as A-, B- and C-capsids, represent empty capsids, scaffold-containing capsids and viral DNA-containing capsids, respectively. The C-capsids are considered as a precursor of infectious virus.

There remains an unmet need to develop new therapeutic strategies for herpesvirus infections targeting other replication steps than DNA replication and inducing fewer adverse effects. Addressing this issue, in this review, we will discuss recent findings on HCMV and herpesvirus capsid assembly and DNA packaging and further explain the potential of capsid and terminase proteins as new antiviral targets for the development of new effective treatments for HCMV infections.

2. Assembly of Herpesvirus Capsids

The capsid structure of herpesviruses was resolved by cryo-electron microscopy, which confirmed that the HCMV three-dimensional capsid structure is similar to the alpha- and gamma-herpesviruses' capsid structure in overall organization [7,8]. The HCMV genome is twice the size of the VZV genome and >50% larger than the HSV-1 genome [9]. Despite enclosing a much larger genome, the size of the HCMV capsid is similar to that of HSV-1 and to those of other herpesviruses, which range around a diameter of 100 nm [10]. Infectious herpesvirus virions have an icosahedral capsid with a triangulation number (T) of 16, composed of 150 hexons that constitute the 30 edges and 20 faces of the icosahedron, with 11 pentons occupying 11 of 12 vertices and 320 triplexes that link the pentons and hexons together. Proteins forming an annular structure named the 'portal' occupy the twelfth vertex [11]. The procapsid is a complex two-shell structure containing various proteins, including the major capsid protein (MCP) and the smallest capsid protein (SCP) (Table 1). Each protein is specifically designed to associate with the final structure in a precise manner [11] (Figure 2).

Table 1. Herpesvirus genes involved in capsid assembly and DNA packaging steps.

	α Herpesviruses		β Herpesviruses		γ Herpesviruses		Notes
	HSV-1	VZV	HCMV	HHV-6	HHV-8	EBV	
Genes encoding capsid proteins	<i>UL19</i>	<i>ORF40</i>	<i>UL86</i>	<i>U57</i>	<i>ORF25</i>	<i>BcLF1</i>	MCP: component of hexons and pentons
	<i>UL18</i>	<i>ORF41</i>	<i>UL85</i>	<i>U56</i>	<i>ORF26</i>	<i>BDLF1</i>	Triplex dimer linking hexons and pentons together
	<i>UL38</i>	<i>ORF20</i>	<i>UL46</i>	<i>U29</i>	<i>ORF62</i>	<i>BORF1</i>	Triplex monomer linking hexons and pentons together
	<i>UL35</i>	<i>ORF23</i>	<i>UL48a</i>	<i>U32</i>	<i>ORF65</i>	<i>BFRF3</i>	SCP: located on tips of hexons
	<i>UL26</i>	<i>ORF33</i>	<i>UL80</i>	<i>U53</i>	<i>ORF17</i>	<i>BVRF2</i>	Maturational protease: generates mature forms of scaffolding proteins
	<i>UL26.5</i>	<i>ORF33.5</i>	<i>UL80.5</i>	<i>U53.5</i>	<i>ORF17.5</i>	<i>BdRF1</i>	Scaffolding protein removed from capsid during DNA packaging
	<i>UL6</i>	<i>ORF54</i>	<i>UL104</i>	<i>U76</i>	<i>ORF43</i>	<i>BBRF1</i>	Portal protein: forms a dodecameric ring at one of the twelve capsid vertexes, complexed with terminase subunit
Genes encoding DNA-packaging proteins	<i>UL28</i>	<i>ORF30</i>	<i>UL56</i>	<i>U40</i>	<i>ORF7</i>	<i>BALF3</i>	Subunit of terminase: "pac" site-specific binding, capsid-associated
	<i>UL15</i>	<i>ORF42/45</i>	<i>UL89</i>	<i>U66</i>	<i>ORF29</i>	<i>BGRF1/BDRF1</i>	Subunit of terminase: ATPase subunit, putative nuclease domain
	<i>UL33</i>	<i>ORF25</i>	<i>UL51</i>	<i>U35</i>	<i>ORF67A</i>	<i>BFRF1A</i>	Interacts with terminase and mediates their correct subnuclear localization
	<i>UL32</i>	<i>ORF26</i>	<i>UL52</i>	<i>U36</i>	<i>ORF68</i>	<i>BFLF1</i>	Putative protein involved in capsid localization in the nucleus
	<i>UL25</i>	<i>ORF34</i>	<i>UL77</i>	<i>U50</i>	<i>ORF19</i>	<i>BVRF1</i>	Forms an asymmetric dimer and interacts with pUL17 and the nuclear egress complex
	<i>UL17</i>	<i>ORF43</i>	<i>UL93</i>	<i>U64</i>	<i>ORF32</i>	<i>BGLF1</i>	Anchors terminase to the capsid and is involved in determining the site of the first cleavage reaction

HSV-1: human herpesvirus type 1; VZV: varicella-zoster virus; HCMV: human cytomegalovirus; HHV-8: human herpesvirus type 8; EBV: Epstein-Barr virus; MCP: major capsid protein; SCP: smallest capsid protein.

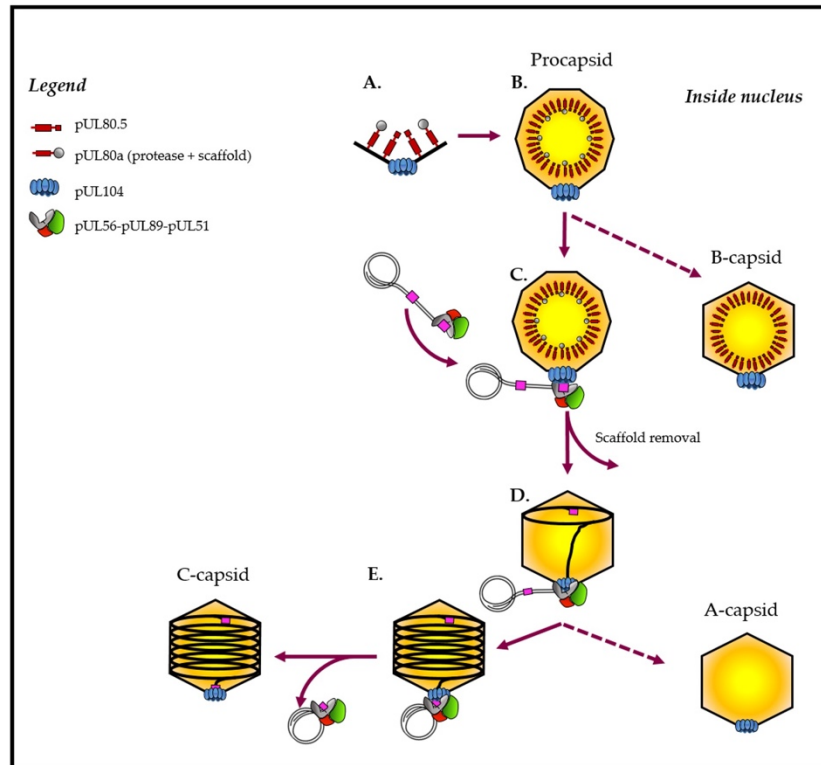


Figure 2. Capsid formation and DNA packaging of herpesviruses: model of HCMV. (A,B) The intranuclear capsid formation is initiated by the assembly of capsid proteins comprising MCP (black), SCP (black), triplexes (black), portal proteins (blue) and scaffold proteins (red and grey). (C) Maturation of the nucleocapsid is achieved by activating the maturational protease, which performs proteolytic digestion of the scaffold. At the same time, the terminase complex recognizes the “pac” motifs (“cis-acting packaging signal”) represented in pink. (D) The complex then performs an initial cleavage of viral DNA and exerts its ATPase activity to power the translocation of a unit-length DNA genome into the nucleocapsid. (E) Terminase proteins perform a second cleavage and release viral DNA into the capsid. Finally, the complex dissociates from the filled capsid and is ready for the next DNA-packaging step.

2.1. The Major Capsid Protein (MCP)

The most abundant protein components of the outer shell are the MCPs. Capsids comprise 11 pentons and 150 hexons that are divided into five and six MCP copies, respectively. In HCMV, the viral gene *UL86* encodes the major capsid protein pUL86, composed of 1370 amino acids (Figure 3). pUL86 is essential for HCMV capsid formation and the generation of viral progeny. This is one of the most conserved proteins in herpesviruses [12] (Figure 3, Table 1). The MCP domains are organized into two regions formed by distinct domains (Figure 3): a tower region composed of the upper (amino acids (aa) 481 to 1031), channel (389 to 480 and 1322 to 1370), buttress (1107 to 1321) and helix-hairpin (190 to 233) domains, which make up the penton and hexon capsomer protrusions, and a floor region composed of the N-lasso (1 to 59), dimerization (291 to 362) and Johnson-fold (60 to 189, 234 to 290, 363 to 397 and 1032 to 1106) domains [13]. Superposition of the cryo-electron microscopy structure of HCMV MPC (pUL86) and HSV-1 MCP (VP5) has shown strong similarities. Differences observed are more pronounced in the N-lasso and upper domain, in particular at the top of the upper domain where SCP binding occur (Figure 3). This similarity of secondary and tertiary structures was also demonstrated through structural alignments based on the VP5ud model and the HCMV MCP model’s upper domain [9]. For HHV-8, although the structures are similar, a loop in the HSV-1 MCP is replaced by a helix in HHV-8, producing a groove into which an SCP binds [13].

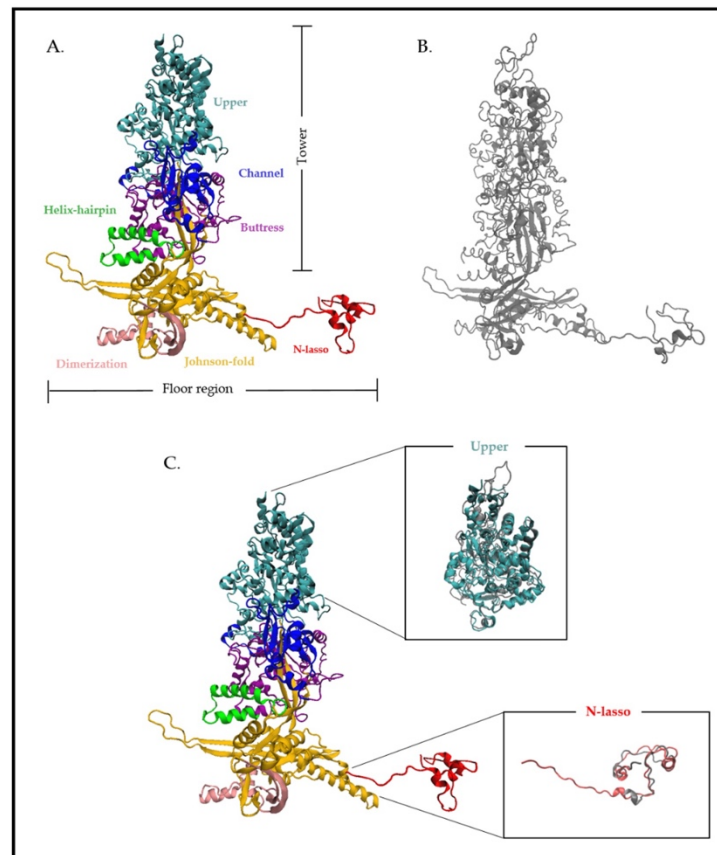


Figure 3. Atomic structure of the HCMV major capsid protein (MCP) pUL86 and the HSV-1 MCP VP5. (A) Cryo-electron microscopy structure of the HCMV MCP pUL86 (each domain is highlighted in different colors). (B) Cryo-electron microscopy structure of the HSV-1 MCP VP5. (C) Partial superposition of the upper and N-lasso domain of pUL86 and VP5. Superposition of the proteins shows a higher atomic divergence for both the upper and N-lasso domains. The analysis is based on the HCMV and HSV-1 capsid structure (PDB: 5VKU and 6CGR) using Visual Molecular Dynamics (VMD 1.9.3).

2.2. The Smallest Capsid Protein (SCP)

The *UL48.5* gene encodes the smallest HCMV protein. This protein of 75 amino acids, essential for HCMV viral growth, would participate in the cohesion of the capsid by coating the ends of the hexons and pentons [14]. Unlike in HCMV, where SCPs bind hexons and pentons so that exactly one SCP binds each MCP, the HSV-1 SCP binds only hexon MCPs [9,15]. Moreover, the SCP in HSV-1 is nonessential for viral growth in cell culture [16].

2.3. External Scaffolding Proteins: Triplex Proteins

The triplexes sit atop the MCP N-lasso triangle and are critical for capsid morphogenesis, most likely linking pentons and hexons together, directing assembly and stabilizing the structure prior to maturation. There are 320 of them in the capsid. Triplexes are heterotrimers consisting of two dimer-forming parts of the minor capsid protein (mCP),

coupled with a single copy of the minor capsid binding protein (mCP-bp) [14]. The mCP of HCMV, pUL85, is a protein composed of 306 amino acids that forms dimers [9] (Table 1). The HCMV mCP-bp is encoded by the *UL46* gene (Table 1).

2.4. Maturation Protease and Internal Scaffolding Protein from the Fusion Protein

In addition to the structural proteins, capsid assembly involves the formation of scaffold proteins for the generation of the capsid subunit and the procapsid structures. The scaffolding proteins of HCMV have been identified as gene products of the *UL80a* and *UL80.5* open reading frames (ORFs) [17]. *UL80a* encodes the assembly protein precursor, which is proteolytically processed into protease and scaffold domains. The scaffold domain corresponds to the C-terminus (C-term; pUL80, aa 336 to 708) and the protease (also called assemblin, pUL80a) to the N-terminus (N-term; pUL80, aa 1 to 256). The protease is subsequently autocatalytically cleaved into two more peptides [17]. Three homologs are reported in HSV-1, VP21 (pUL26), VP24 (pUL26) and VP22a (pUL26.5) [18] (Table 1). The assembly protein, encoded by *UL80.5*, directly interacts with the MCP (pUL86) [19]. Importantly, the MCP–assembly protein interaction is essential for the nuclear translocation of the MCP [20]. A conserved domain in the N-term of pUL80.5 promotes self-interaction and has been suggested to lead to the generation of multimers [20]. The self-interactions together with the MCP is thought to catalyze the formation of intranuclear hexons and pentons [21]. The HSV-1 homolog *UL26.5* encodes preVP22A, which interacts with the HSV-1 MCP (VP5) through its C-term 25 amino acids that remain inside A-, B- and C-capsids [22]. Specifically, 12 hydrophobic amino acids at this C-term end are critical for the interaction, suggesting that the preVP22A–VP5 interaction is a hydrophobic interaction [22].

Although the scaffold plays a central role in capsid assembly, to date, no scaffolding protein has been found within the mature capsid or the virion (Figure 2). *UL80a* encodes the assembly protein precursor composed of the protease (pUL80a) and the assembly protein (pUL80.5). Like HCMV, the HSV-1 pUL26 is initially extended at its N-term by the protease, and a linker and its C-term part is identical to the major form, pUL26.5 [23]. This fusion provides a convenient mechanism for incorporating the protease into the assembling procapsid. The final step of the capsid maturation in HCMV and HSV-1 involves a proteolytic cleavage for the MCP binding domain of pUL80.5 and preVP22a, respectively [24,25]. Bioinformatics analysis has identified a protein family predicted to share the canonical herpesvirus protease fold, having conserved Ser and His residues in their active sites [23].

2.5. The Portal Protein

The capsid is also composed of a portal that occupies one of the 12 vertices of the capsid and plays a critical role for herpesvirus replication. This arrangement of 12 monomers forms a ring, allowing herpesvirus DNA to be incorporated into the preformed capsid. Portal proteins act as the docking site for the terminase–DNA complex. pUL104 is the HCMV dodecameric portal protein, with 12-fold symmetry. pUL104 directly interacts with the large terminase subunit pUL56. This interaction was shown to be essential for DNA insertion into the capsid [26]. pUL6, the HSV-1 portal protein, is one of the most studied portal proteins in herpesviruses, and its structure was recently resolved using cryo-electron microscopy [27]. Structurally, a portal monomer consists of five domains; the wing, stem, clip, β -hairpin and wall [27]. The twelve monomers are arranged such that their loop-rich wing domains form the outer periphery of the complex. The remaining stem, clip, β -hairpin and wall domains line the interior of the portal's DNA translocation channel. The formation of a stable ring requires a putative leucine zipper, as well as disulfide bonding between subunits [28,29]. It has been shown that the portal protein pUL6 interacts with the scaffolding protein VP22a. This interaction requires a region corresponding to amino acids 143 to 151 of VP22a and is essential for viral replication, DNA cleavage/packaging and incorporation of the portal into capsids [11].

3. Viral DNA Cleavage/Packaging

The replication of HCMV DNA initiates from the HCMV DNA replication origin and forms concatemers by rolling circle-type replication. The DNA packaging and maturation are two steps that take place simultaneously in the nucleus. The DNA-packaging process happens as follows [30]: (1) After translocating into the nucleus, (2) the terminase complex recognizes the cis-regulatory “*pac*” (“cis-acting packaging signal”) motifs located in the “*a*” part of the HCMV genome and recruits a procapsid. (3) The complex then performs an initial cleavage of the viral DNA (4) and exerts its ATPase activity to power the translocation of a unit-length DNA genome into the procapsid. (5) HCMV terminase proteins then perform a second cleavage, releasing viral DNA into the capsid via an interaction with pUL104 protein. (6) Finally, the complex is ready for the next DNA-packaging step (Figures 1 and 2). In general, terminase complexes are hetero-oligomers composed of three core proteins (pUL56, pUL89 and pUL51 for HCMV and pUL28, pUL15 and pUL33 for HSV-1), each carrying a different function required for the packaging process [30–32]. At least three other proteins (pUL52, pUL77 and pUL93 for HCMV and pUL32, pUL25 and pUL17 for HSV-1) seem to be part of the terminase complex and/or participate in the DNA cleavage/packaging process [32–36].

3.1. The Terminase Large Subunit

The large subunit pUL56 is a protein composed of 850 amino acids and 12 conserved regions [37] and is encoded by the ORF *UL56* located on the unique long region of the HCMV genome (Figure 4). pUL56 is a homolog of the HSV-1 protein pUL28, which has an essential role in HSV-1 genome packaging [38,39]. The predicted molecular weight of pUL56, based on amino acid composition, is 96 kDa. However, some studies, including our personal experiments, have shown that it migrates with a higher apparent molecular weight on Western blots (130 kDa). pUL56 is involved in the ATPase activity of the complex and it specifically recognizes and interacts with the “*pac*” motifs [30]. The presence of a nuclear localization signal (NLS) at the amino acid position 816–827 was validated in pUL56 by Giesen et al. [40]. Sequential substitutions by alanine scanning indicated the importance of the residues R and K at positions 822 and 823. In addition to allowing the translocation of pUL56 in the nucleus via the importin-dependent pathway, this NLS also allows the transport of the whole complex (pUL89–pUL56–pUL51) [40] (Figure 5). The specific recognition of these motifs is necessary for the cleavage of a genomic unit. Studies also demonstrated that pUL28 interacted with the “*pac*” motif [41]. The suspected ATP binding site is located in the C-term half of pUL56 and involves the amino acids ₇₀₉YNETFGKQ₇₁₆ (in HCMV pUL56) [42,43]. A specific interaction between the C-terminal part of pUL56 and pUL89 was also detected by coimmunoprecipitation [44]. Importantly, we have shown that a short sequence of ten residues located in the C-terminal region of pUL56 (₆₇₁WMVVKYMGFF₆₈₀ in HCMV pUL56) is essential for this interaction [45] (Figure 4). Recently, we suggested that pUL56 belongs to the LAGLIDADG homing endonucleases family. This recent finding was supported by the identification of a LATLNDIERFL and a zinc finger pattern in the N-term of pUL56 essential for viral replication [46] (Figure 4). We thus proposed that two subunits of pUL56 use the LATLNDIERFL pattern as an interface domain where the hydrophobic amino acids L134, L137, I140 and L144 dimerize. The acidic residue E141 may contribute to the nuclease sites. Residues C191, C194, C217 and H219 in HCMV pUL56 or C197, C200, C223 and H225 in HSV-1 pUL28 are conserved and most likely correspond to the zinc coordinating amino acids within the zinc-finger pattern (Figure 4). Interestingly, the LATLNDIERFL and zinc-finger patterns are located near the pUL56 region encompassing mutations that facilitate letermovir resistance. Thus, these motifs could be involved in the mechanism of action of letermovir [46]. However, for most of the identified patterns, functional studies are needed to investigate their function in the viral life cycle.

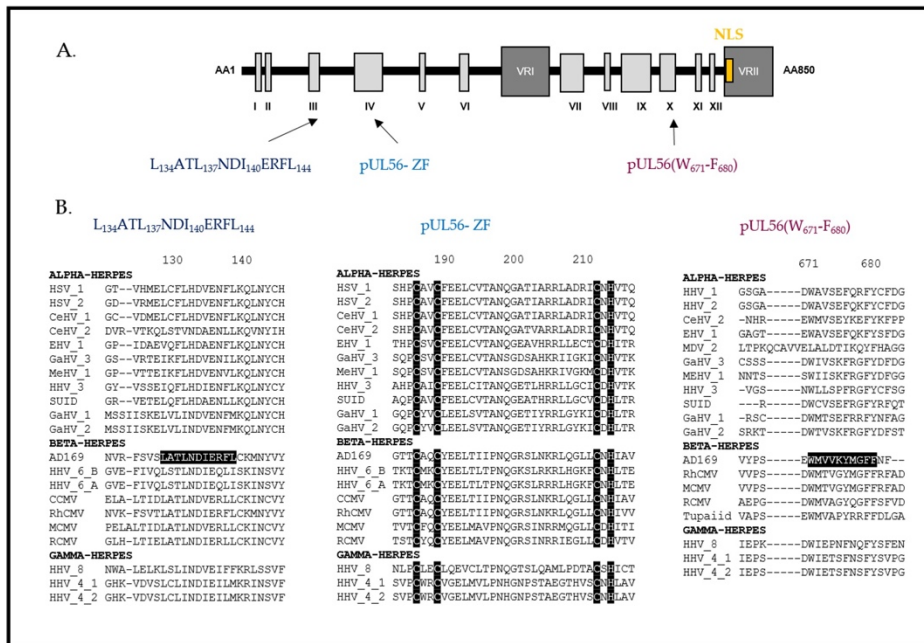


Figure 4. Structure of the HCMV terminase subunit pUL56 (adapted from [37,46]). (A) pUL56 is composed of 12 conserved (I–XII) and 2 variable regions and comprises 3 essential domains annotated LATLNDIERFL, pUL56-ZF (zinc finger) and pUL56 (W₆₇₁–F₆₈₀). (B) Sequence alignments of conserved regions from various herpesviruses belonging to the α , β and γ subfamilies of herpesviruses. The nuclear localization signal (NLS) of pUL56 is shown by a yellow box at the amino acid position 816 to 827. Sequence numbering is consistent with that of the HCMV reference strain AD169 residues. Key residues involved in the formation of the three patterns are shown as white letters on a black background.

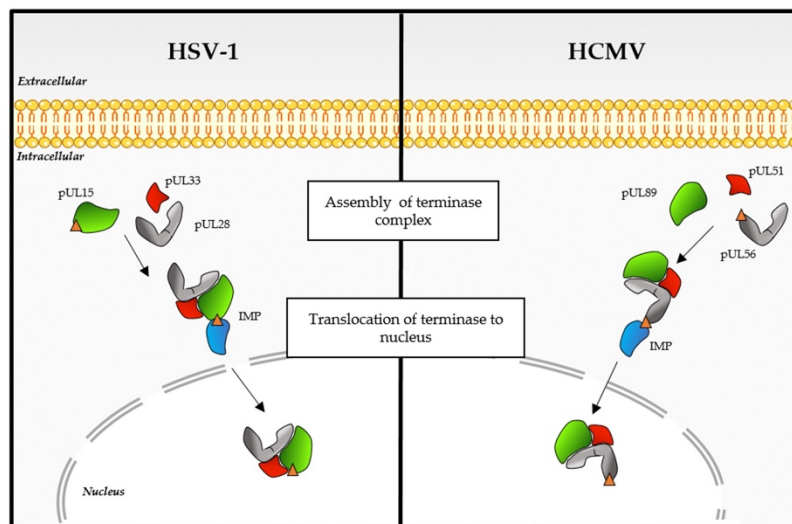


Figure 5. Nuclear import of the terminase complex: model for HSV-1 and HCMV. The terminase complex is represented as follows: pUL56 (HCMV) and pUL28 (HSV-1) are in grey, pUL89 (HCMV) and pUL15 (HSV-1) are in green and pUL51 (HCMV) and pUL33 (HSV-1) are in red. The importin (IMP) is represented in blue, and the nuclear localization signal (NLS) is shown as an orange triangle. Once the complex is associated, its translocation in the nucleus is mediated via the importin-dependent pathway.

3.2. The Terminase Small Subunit

The small subunit pUL89 is a protein of 674 amino acids encoded by the ORF *UL89* located on the unique long region of the HCMV genome (Figure 6). pUL89 is a homolog of the HSV-1 protein pUL15. This protein of approximately 75 kDa possesses a putative nuclease domain and a putative DNA binding domain, implying that the aspartate 463 is involved in nuclease activity and the arginine 544 in DNA binding [31]. Different conserved patterns were highlighted in silico, comprising an adenine binding site (156EPFQ159 in HCMV pUL89), a Walker A motif (213PRRHGKT219 in HCMV pUL89), a Walker B motif (305LLLLVDEAHFI314 in HCMV pUL89) and pattern III (337SST339 in HCMV pUL89) [47] (Figure 6). To date, pUL89 has only been shown to have in vitro nuclease activity and a 30% increase in the ATPase activity of pUL56 when they are interacting [42,48,49]. Whereas the HSV-1 homolog pUL15 showed an NLS that gives the ability to enter the cell nucleus independently [50], the nuclear localization of HCMV pUL89 and pUL51 required three subunits [51] (Figure 5). For pUL56, as for most of the identified patterns, functional studies are needed to investigate its function in the viral cycle.

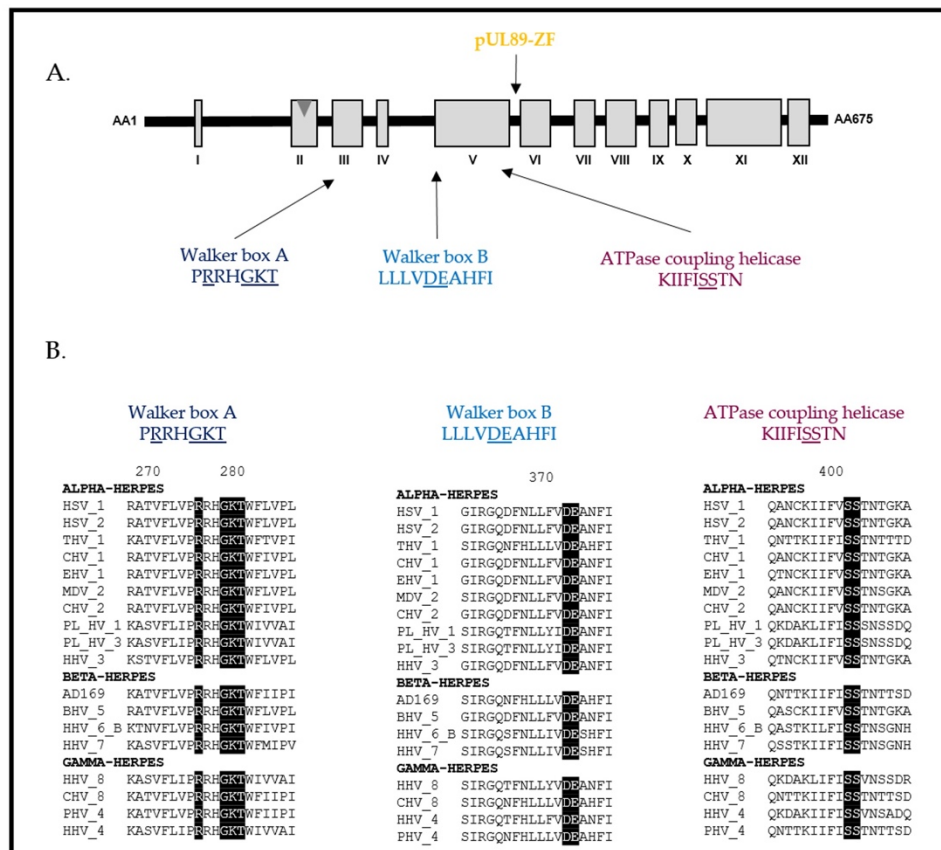


Figure 6. Structure of the HCMV terminase subunit pUL89 (adapted from [37,46]). (A) pUL89 is composed of 12 conserved regions (I–XII) and comprises putative functional domains such as the pUL89 zinc-finger domain, annotated pUL89-ZF, and the adenine binding site (Walker A box, Walker B box and ATPase coupling helicase). Underlined amino acids are residues involved in the activities of each domain. (B) Sequence alignments of conserved regions from various herpesviruses belonging to the α , β and γ subfamilies of herpesviruses. Sequence numbering is consistent with that of the HCMV reference strain AD169 residues. Key residues involved in the formation of the three patterns are shown as white letters on a black background.

3.3. Additional Proteins Contribute to the HCMV DNA Cleavage/Packaging Process

Unlike bacteriophages, which have a large subunit (Lter) and a small subunit (Ster), herpesviruses have more proteins involved in the terminase complex. At least three additional HCMV proteins, namely pUL52, pUL77 and pUL93, contribute to the DNA cleavage/packaging process [32–36]. These proteins are homologous to the HSV-1 proteins pUL33, pUL32, pUL25 and pUL17, respectively. The *UL51* gene encodes a protein of 157 amino acids that is crucial for DNA cleavage/packaging. pUL51 interacts with the HCMV terminase subunits pUL56 and pUL89 and mediates their correct subnuclear localization [32]. Borst et al. reported that the C-terminal part of pUL51 carries an essential function for the growth of the virus. They have shown that the C-terminal part of pUL51 is sufficient to transport the assembly of the terminase complex (pUL56–pUL89–pUL51) and promote its correct nuclear localization [52]. pUL52 does not seem to be involved in the nuclear localization of the terminase complex. Deletion of this cysteine-rich protein leads to uncleaved HCMV DNA, suggesting that pUL52 is crucial for the HCMV DNA cleavage/packaging process [33]. Although pUL52 is not detected in viral replication compartments, a time-course experiment with pUL32, the HSV-1 homolog of HCMV pUL52, revealed a dynamic localization pattern. Early in the course of infection, pUL32 was found predominantly in replication compartments, while later, its localization became diffuse within the nucleus and the cytoplasm [53]. The precise function of pUL52 remains unknown. However, Albright et al. suggested that the HSV-1 homolog may act to modulate disulfide bond formation during procapsid assembly and maturation. The essential HCMV protein encoded by *UL77* has been shown to interact with many proteins involved in capsid formation, such as the MCP, tegument protein pUL71, terminase complex, portal protein and pUL93, as well as the dsDNA. Although its role has not yet been elucidated, this protein participates in the stability of the entire capsid and plays a key role during viral capsid formation [54,55]. In addition, its HSV-1 pUL25 homolog also seems to be necessary to maintain the stability of the capsid and multiple interactions were also highlighted [56]. pUL93 interacts with pUL77 and components of the nuclear egress complex (pUL50–pUL53–pUL97) and seems to play a key role during viral capsid formation [35,36,57]. Recently, it was shown that pUL17 (pUL93 in HCMV) anchors the terminase complex to the capsid and is involved in determining the site of the first cleavage reaction. In addition, pUL17 interacts with the asymmetric dimer of pUL25 (pUL77 in HCMV) [58].

4. Different Capsid Forms Are Present in the Host Cell: A-, B- and C-Capsids

As mentioned above, the procapsid contains a protease that is crucial for capsid maturation. For all herpesviruses, the protease is activated at the time of DNA packaging, and its cleavage causes a significant rearrangement of the procapsid. The outer shell hence changes from a roughly spherical to an icosahedral shape [11]. The procapsid, the first closed spherical structure formed during the assembly process, is a precursor form of three other capsid types [59]. During infection, three types of capsids are detected within the host cell (Figure 1). These capsids forms, namely A, B and C, represent empty capsids, scaffold-containing capsids and viral DNA-containing capsids, respectively. The morphology of the capsid remains similar regardless of its type, but the protein composition differs on the inner and outer shells of the capsid [9,27,59,60].

C-capsids are identical or at least similar to those found in mature virions. They represent the procapsids that have correctly packaged the viral genome during angularization of the capsid [59]. A-capsids are essentially hollow and do not contain DNA or scaffolding proteins. This type of capsids probably arises after partial or complete DNA packaging [59]. B-capsids contain internal scaffold proteins (i.e., VP22a and VP21 for HSV-1), suggesting that the capsid is either preparing for the packaging step or that the scaffold was not removed in time to allow for DNA packaging [61].

Both A- and B-type HCMV capsids are considered as dead-end products. While all three capsid forms are present in the nucleus and in the cytoplasmic compartments,

C-capsids predominate in the cytoplasm. When released from the cell, A- and B-capsids appear to constitute a population called noninfectious enveloped particles [61].

5. Inhibitors of Terminase and Capsid Proteins for the Treatment of Herpesvirus Infections

Due to their crucial role in the formation of new infectious virions and the lack of counterparts in mammalian cells, the capsid assembly and DNA-packaging steps can be explored for the development of new therapeutic approaches. Targeting viral proteins involved in these both steps has been shown to be an interesting approach for the development of new therapeutic strategies.

Drugs based on the benzimidazole chemical backbone are nucleoside analogs active against HCMV that were originally synthesized by Townsend et al. [62]. Addition of bromine to the 2-position of the core 5,6-dichloro-1- β -D-ribofuranosyl benzimidazole (DCRB) structure yields analogs such as BDCRB (2-bromo-5,6-dichloro-1- β -D-ribofuranosyl benzimidazole) and TCRB (the 2-chloro analog of BDCRB) [63]. The primary mechanism of BDCRB function involves inhibition of the formation of HCMV unit-length genomes. Genetic mapping experiments showed that inhibition of viral DNA maturation is mediated by interactions involving the products of the HCMV *UL89* and *UL56* ORFs [64]. The GlaxoSmithKline compound GW-275175X also targets this step and has a longer plasma half-life [63]. BAY 38-4766, also called tomeglovir, is an inhibitor of HCMV replication. This nonnucleoside inhibitor appears to target the proteins pUL89 and pUL104. Resistance mutations in these two proteins were observed after analysis of resistant strains [65]. Another molecule, WAY-150138, is an N-(4-(3-[5-chloro-2,4-dimethoxyphenyl]-thioureido)-phenyl) acetamide-targeting pUL6 of herpes simplex virus. This molecule inhibits viral replication and DNA packaging and precludes the incorporation of portals into capsids [66]. Although these molecules demonstrate activity on HCMV or HSV viral replication, to date, none of them have been used.

Letermovir (AIC246) is a molecule of the quinazoline class having a specific action on HCMV. Letermovir inhibits the cleavage of viral DNA concatemers and the formation of mature HCMV virions by targeting the pUL56 subunit of the viral terminase complex. Preclinical data obtained for this molecule reveal its very strong antiviral activity and low toxicity compared to other antiviral molecules. In phase II trials, letermovir effectively prevented HCMV infection in recipients of allogeneic hematopoietic cell transplants [67]. The phase III trial started in 2014 (by Merck Sharpe and Dohme Corps) was completed at the end of 2016 ([ClinicalTrials.gov](https://clinicaltrials.gov/ct2/show/study/NCT02137772) Identifier: NCT02137772) and published in 2017 [68]. Under the name Prevydis, letermovir was approved (August 2017) by the US Food and Drug Administration. Prevydis is indicated for the prophylaxis of HCMV reactivation and HCMV disease in HCMV-positive adults receiving [R+] allogeneic hematopoietic stem cell transplantation [5,6]. Whereas mutations associated with letermovir resistance map mainly to the pUL56, various letermovir resistance mutations in *UL89* and *UL51* have been identified [69–72].

Structure and mutagenesis studies revealed essential capsid protein interactions for HHV-8 replication [13]. Polypeptides that mimic the smallest capsid protein to inhibit HHV-8 lytic replication have been developed. In this way, inhibitors mimicking protein interactions may be the molecules of choice for blocking herpesvirus replication. Whether in the form of peptides, polypeptides, antibodies or small drugs, this innovative strategy appears to be promising.

6. Concluding Remarks

The herpesvirus capsid assembly and DNA packaging steps are highly specific and have no counterparts in host mammalian cells. They thus represent targets of choice for antiviral drug development. Understanding the HCMV capsid assembly and DNA-packaging process, together with the structure and function of the necessary components, will enable the development of antivirals with high specificity and low toxicity. This knowledge could constitute an essential starting point for the identification of new antiviral

targets, and consequently, for the development of molecules for preventive or therapeutic purposes. It would also provide a better understanding of the mechanism of action of molecules in development, such as letermovir.

Author Contributions: Writing—original draft preparation, C.M. and G.L.; writing—review and editing, S.A., T.F.B., G.L. and S.H. All authors have read and agreed to the published version of the manuscript.

Funding: This work was supported by a grant from the Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche, Conseil Régional de Nouvelle-Aquitaine and Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale (Inserm). G.L. is the recipient of an ANRS fellowship (ECTZ86820). This study was funded by a Research Grant 2021 from the European Society of Clinical Microbiology and Infectious Diseases (ESCMID) to G.L.

Institutional Review Board Statement: Not applicable.

Informed Consent Statement: Not applicable.

Data Availability Statement: Not applicable.

Conflicts of Interest: The authors declare no conflict of interest.

References

1. Leruez-Ville, M.; Ville, Y. Fetal Cytomegalovirus Infection. *Best Pract. Res. Clin. Obstet. Gynaecol.* **2017**, *38*, 97–107. [[CrossRef](#)]
2. Lurain, N.S.; Chou, S. Antiviral Drug Resistance of Human Cytomegalovirus. *Clin. Microbiol. Rev.* **2010**, *23*, 689–712. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
3. El Chaer, F.; Shah, D.P.; Chemaly, R.F. How I Treat Resistant Cytomegalovirus Infection in Hematopoietic Cell Transplantation Recipients. *Blood* **2016**, *128*, 2624–2636. [[CrossRef](#)]
4. Andouard, D.; Mazon, M.-C.; Ligat, G.; Couvreur, A.; Pouteil-Noble, C.; Cahen, R.; Yasdanpanah, Y.; Deering, M.; Viget, N.; Alain, S.; et al. Contrasting Effect of New HCMV PUL54 Mutations on Antiviral Drug Susceptibility: Benefits and Limits of 3D Analysis. *Antiviral Res.* **2016**, *129*, 115–119. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
5. Ligat, G.; Cazal, R.; Hantz, S.; Alain, S. The Human Cytomegalovirus Terminase Complex as an Antiviral Target: A Close-up View. *FEMS Microbiol. Rev.* **2018**, *42*, 137–145. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
6. Ligat, G.; Muller, C.; Alain, S.; Hantz, S. The terminase complex, a relevant target for the treatment of HCMV infection. *Med. Sci.* **2020**, *36*, 367–375. [[CrossRef](#)]
7. Dai, X.; Zhou, Z.H. Structure of the Herpes Simplex Virus 1 Capsid with Associated Tegument Protein Complexes. *Science* **2018**, *360*. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
8. Sun, J.; Liu, C.; Peng, R.; Zhang, F.-K.; Tong, Z.; Liu, S.; Shi, Y.; Zhao, Z.; Zeng, W.-B.; Gao, G.F.; et al. Cryo-EM Structure of the Varicella-Zoster Virus A-Capsid. *Nat. Commun.* **2020**, *11*, 4795. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
9. Yu, X.; Jih, J.; Jiang, J.; Zhou, Z.H. Atomic Structure of the Human Cytomegalovirus Capsid with Its Securing Tegument Layer of Pp150. *Science* **2017**, *356*. [[CrossRef](#)]
10. Bhella, D.; Rixon, F.J.; Dargan, D.J. Cryomicroscopy of Human Cytomegalovirus Virions Reveals More Densely Packed Genomic DNA than in Herpes Simplex Virus Type 1. *J. Mol. Biol.* **2000**, *295*, 155–161. [[CrossRef](#)]
11. Baines, J.D. Herpes Simplex Virus Capsid Assembly and DNA Packaging: A Present and Future Antiviral Drug Target. *Trends Microbiol.* **2011**, *19*, 606–613. [[CrossRef](#)]
12. Chee, M.; Rudolph, S.A.; Plachter, B.; Barrell, B.; Jahn, G. Identification of the Major Capsid Protein Gene of Human Cytomegalovirus. *J. Virol.* **1989**, *63*, 1345–1353. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
13. Dai, X.; Gong, D.; Lim, H.; Jih, J.; Wu, T.-T.; Sun, R.; Zhou, Z.H. Structure and Mutagenesis Reveal Essential Capsid Protein Interactions for KSHV Replication. *Nature* **2018**, *553*, 521–525. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
14. Arvin, A.; Arvin, A.M. *Human Herpesviruses: Biology, Therapy, and Immunoprophylaxis*; Cambridge University Press: Cambridge, UK; New York, NY, USA, 2007; ISBN 9781280916946.
15. Booy, F.P.; Trus, B.L.; Newcomb, W.W.; Brown, J.C.; Conway, J.F.; Steven, A.C. Finding a Needle in a Haystack: Detection of a Small Protein (the 12-KDa VP26) in a Large Complex (the 200-MDa Capsid of Herpes Simplex Virus). *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1994**, *91*, 5652–5656. [[CrossRef](#)]
16. Desai, P.; DeLuca, N.A.; Person, S. Herpes Simplex Virus Type 1 VP26 Is Not Essential for Replication in Cell Culture but Influences Production of Infectious Virus in the Nervous System of Infected Mice. *Virology* **1998**, *247*, 115–124. [[CrossRef](#)]
17. Varnum, S.M.; Streblow, D.N.; Monroe, M.E.; Smith, P.; Auberry, K.J.; Paša-Tolić, L.; Wang, D.; Rodland, K.; Wiley, S.; Britt, W.; et al. Identification of Proteins in Human Cytomegalovirus (HCMV) Particles: The HCMV Proteome. *J. Virol.* **2004**, *78*, 7. [[CrossRef](#)]
18. Liu, F.Y.; Roizman, B. The Herpes Simplex Virus 1 Gene Encoding a Protease Also Contains within Its Coding Domain the Gene Encoding the More Abundant Substrate. *J. Virol.* **1991**, *65*, 5149–5156. [[CrossRef](#)]

19. Wood, L.J.; Baxter, M.K.; Plafker, S.M.; Gibson, W. Human Cytomegalovirus Capsid Assembly Protein Precursor (PUL80.5) Interacts with Itself and with the Major Capsid Protein (PUL86) through Two Different Domains. *J. Virol.* **1997**, *71*, 179–190. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
20. Beaudet-Miller, M.; Zhang, R.; Durkin, J.; Gibson, W.; Kwong, A.D.; Hong, Z. Virus-Specific Interaction between the Human Cytomegalovirus Major Capsid Protein and the C Terminus of the Assembly Protein Precursor. *J. Virol.* **1996**, *70*, 8081–8088. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
21. Gibson, W. Structure and Assembly of the Virion. *Intervirology* **1996**, *39*, 389–400. [[CrossRef](#)]
22. Hong, Z.; Beaudet-Miller, M.; Durkin, J.; Zhang, R.; Kwong, A.D. Identification of a Minimal Hydrophobic Domain in the Herpes Simplex Virus Type 1 Scaffolding Protein Which Is Required for Interaction with the Major Capsid Protein. *J. Virol.* **1996**, *70*, 533–540. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
23. Cardone, G.; Heymann, J.B.; Cheng, N.; Trus, B.L.; Steven, A.C. Procapsid Assembly, Maturation, Nuclear Exit: Dynamic Steps in the Production of Infectious Herpesvirions. In *Viral Molecular Machines*; Rossmann, M.G., Rao, V.B., Eds.; Springer: Boston, MA, USA, 2012; Volume 726, pp. 423–439. ISBN 9781461409793.
24. Singer, G.P.; Newcomb, W.W.; Thomsen, D.R.; Homa, F.L.; Brown, J.C. Identification of a Region in the Herpes Simplex Virus Scaffolding Protein Required for Interaction with the Portal. *J. Virol.* **2005**, *79*, 132–139. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
25. Zhou, Z.H.; Macnab, S.J.; Jakana, J.; Scott, L.R.; Chiu, W.; Rixon, F.J. Identification of the Sites of Interaction between the Scaffold and Outer Shell in Herpes Simplex Virus-1 Capsids by Difference Electron Imaging. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1998**, *95*, 2778–2783. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
26. Dittmer, A.; Drach, J.C.; Townsend, L.B.; Fischer, A.; Bogner, E. Interaction of the Putative Human Cytomegalovirus Portal Protein PUL104 with the Large Terminase Subunit PUL56 and Its Inhibition by Benzimidazole-d-Ribonucleosides. *J. Virol.* **2005**, *79*, 14660–14667. [[CrossRef](#)]
27. Liu, Y.-T.; Jih, J.; Dai, X.; Bi, G.-Q.; Zhou, Z.H. Cryo-EM Structures of Herpes Simplex Virus Type 1 Portal Vertex and Packaged Genome. *Nature* **2019**, *570*, 257–261. [[CrossRef](#)]
28. Albright, B.S.; Nellissery, J.; Szczepaniak, R.; Weller, S.K. Disulfide Bond Formation in the Herpes Simplex Virus 1 UL6 Protein Is Required for Portal Ring Formation and Genome Encapsidation. *J. Virol.* **2011**, *85*, 8616–8624. [[CrossRef](#)]
29. Nellissery, J.K.; Szczepaniak, R.; Lamberti, C.; Weller, S.K. A Putative Leucine Zipper within the Herpes Simplex Virus Type 1 UL6 Protein Is Required for Portal Ring Formation. *J. Virol.* **2007**, *81*, 8868–8877. [[CrossRef](#)]
30. Bogner, E.; Radsak, K.; Stinski, M.F. The Gene Product of Human Cytomegalovirus Open Reading Frame UL56 Binds the Pac Motif and Has Specific Nuclease Activity. *J. Virol.* **1998**, *72*, 2259–2264. [[CrossRef](#)]
31. Theiß, J.; Sung, M.W.; Holzenburg, A.; Bogner, E. Full-Length Human Cytomegalovirus Terminase PUL89 Adopts a Two-Domain Structure Specific for DNA Packaging. *PLoS Pathog.* **2019**, *15*, e1008175. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
32. Borst, E.M.; Kleine-Albers, J.; Gabaev, I.; Babic, M.; Wagner, K.; Binz, A.; Degenhardt, I.; Kalesse, M.; Jonjic, S.; Bauerfeind, R.; et al. The Human Cytomegalovirus UL51 Protein Is Essential for Viral Genome Cleavage-Packaging and Interacts with the Terminase Subunits PUL56 and PUL89. *J. Virol.* **2013**, *87*, 1720–1732. [[CrossRef](#)]
33. Borst, E.M.; Wagner, K.; Binz, A.; Sodeik, B.; Messerle, M. The Essential Human Cytomegalovirus Gene UL52 Is Required for Cleavage-Packaging of the Viral Genome. *J. Virol.* **2008**, *82*, 2065–2078. [[CrossRef](#)]
34. Borst, E.M.; Bauerfeind, R.; Binz, A.; Stephan, T.M.; Neuber, S.; Wagner, K.; Steinbrück, L.; Sodeik, B.; Lenac Roviš, T.; Jonjic, S.; et al. The Essential Human Cytomegalovirus Proteins PUL77 and PUL93 Are Structural Components Necessary for Viral Genome Encapsidation. *J. Virol.* **2016**. [[CrossRef](#)]
35. DeRussy, B.M.; Tandon, R. Human Cytomegalovirus PUL93 Is Required for Viral Genome Cleavage and Packaging. *J. Virol.* **2015**. [[CrossRef](#)]
36. Köppen-Rung, P.; Dittmer, A.; Bogner, E. Intracellular Distribution of Capsid-Associated PUL77 of Human Cytomegalovirus and Interactions with Packaging Proteins and PUL93. *J. Virol.* **2016**, *90*, 5876–5885. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
37. Champier, G.; Couvreur, A.; Hantz, S.; Rametti, A.; Mazon, M.-C.; Bouaziz, S.; Denis, F.; Alain, S. Putative Functional Domains of Human Cytomegalovirus PUL56 Involved in Dimerization and Benzimidazole D-Ribonucleoside Activity. *Antivir. Ther.* **2008**, *13*, 643–654.
38. Bogner, E.; Reschke, M.; Reis, B.; Mockenhaupt, T.; Radsak, K. Identification of the Gene Product Encoded by ORF UL56 of the Human Cytomegalovirus Genome. *Virology* **1993**, *196*, 290–293. [[CrossRef](#)]
39. Addison, C.; Rixon, F.J.; Preston, V.G. Herpes Simplex Virus Type 1 UL28 Gene Product Is Important for the Formation of Mature Capsids. *J. Gen. Virol.* **1990**, *71 Pt 10*, 2377–2384. [[CrossRef](#)]
40. Giesen, K.; Radsak, K.; Bogner, E. The Potential Terminase Subunit of Human Cytomegalovirus, PUL56, Is Translocated into the Nucleus by Its Own Nuclear Localization Signal and Interacts with Importin α . *J. Gen. Virol.* **2000**, *81*, 2231–2244. [[CrossRef](#)]
41. Adelman, K.; Salmon, B.; Baines, J.D. Herpes Simplex Virus DNA Packaging Sequences Adopt Novel Structures That Are Specifically Recognized by a Component of the Cleavage and Packaging Machinery. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2001**, *98*, 3086–3091. [[CrossRef](#)]
42. Hwang, J.-S.; Bogner, E. ATPase Activity of the Terminase Subunit PUL56 of Human Cytomegalovirus. *J. Biol. Chem.* **2002**, *277*, 6943–6948. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
43. Scholz, B.; Rechter, S.; Drach, J.C.; Townsend, L.B.; Bogner, E. Identification of the ATP-Binding Site in the Terminase Subunit PUL56 of Human Cytomegalovirus. *Nucleic Acids Res.* **2003**, *31*, 1426–1433. [[CrossRef](#)]

44. Thoma, C.; Borst, E.; Messerle, M.; Rieger, M.; Hwang, J.-S.; Bogner, E. Identification of the Interaction Domain of the Small Terminase Subunit PUL89 with the Large Subunit PUL56 of Human Cytomegalovirus. *Biochemistry* **2006**, *45*, 8855–8863. [[CrossRef](#)]
45. Ligat, G.; Jacquet, C.; Chou, S.; Couvreur, A.; Alain, S.; Hantz, S. Identification of a Short Sequence in the HCMV Terminase PUL56 Essential for Interaction with PUL89 Subunit. *Sci. Rep.* **2017**, *7*, 8796. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
46. Ligat, G.; Couvreur, A.; Cazal, R.; Alain, S.; Hantz, S. Highlighting of a LAGLIDADG and a Zing Finger Motifs Located in the PUL56 Sequence Crucial for HCMV Replication. *Viruses* **2019**, *11*, 1093. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
47. Champier, G.; Hantz, S.; Couvreur, A.; Stuppfler, S.; Mazon, M.-C.; Bouaziz, S.; Denis, F.; Alain, S. New Functional Domains of Human Cytomegalovirus PUL89 Predicted by Sequence Analysis and Three-Dimensional Modelling of the Catalytic Site DEXDc. *Antivir. Ther.* **2007**, *12*, 217–232.
48. Leffers, G.; Rao, V.B. Biochemical Characterization of an ATPase Activity Associated with the Large Packaging Subunit Gp17 from Bacteriophage T4. *J. Biol. Chem.* **2000**, *275*, 37127–37136. [[CrossRef](#)]
49. Scheffczik, H. The Terminase Subunits PUL56 and PUL89 of Human Cytomegalovirus Are DNA-Metabolizing Proteins with Toroidal Structure. *Nucleic Acids Res.* **2002**, *30*, 1695–1703. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
50. Sankhala, R.S.; Lokareddy, R.K.; Cingolani, G. Divergent Evolution of Nuclear Localization Signal Sequences in Herpesvirus Terminase Subunits. *J. Biol. Chem.* **2016**, *291*, 11420–11433. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
51. Neuber, S.; Wagner, K.; Goldne, T.; Lischka, P.; Steinbrueck, L.; Messerle, M.; Borst, E.M. Mutual Interplay between the Human Cytomegalovirus Terminase Subunits PUL51, PUL56, and PUL89 Promotes Terminase Complex Formation. *J. Virol.* **2017**. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
52. Neuber, S.; Wagner, K.; Messerle, M.; Borst, E.M. The C-Terminal Part of the Human Cytomegalovirus Terminase Subunit PUL51 Is Central for Terminase Complex Assembly. *J. Gen. Virol.* **2017**. [[CrossRef](#)]
53. Albright, B.S.; Kosinski, A.; Szczepaniak, R.; Cook, E.A.; Stow, N.D.; Conway, J.F.; Weller, S.K. The Putative Herpes Simplex Virus 1 Chaperone Protein UL32 Modulates Disulfide Bond Formation during Infection. *J. Virol.* **2015**, *89*, 443–453. [[CrossRef](#)]
54. Meissner, C.S.; Köppen-Rung, P.; Dittmer, A.; Lapp, S.; Bogner, E. A “Coiled-Coil” Motif Is Important for Oligomerization and DNA Binding Properties of Human Cytomegalovirus Protein UL77. *PLoS ONE* **2011**, *6*, e25115. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
55. Meissner, C.S.; Suffner, S.; Schauflinger, M.; von Einem, J.; Bogner, E. A Leucine Zipper Motif of a Tegument Protein Triggers Final Envelopment of Human Cytomegalovirus. *J. Virol.* **2012**, *86*, 3370–3382. [[CrossRef](#)]
56. Cockrell, S.K.; Huffman, J.B.; Toropova, K.; Conway, J.F.; Homa, F.L. Residues of the UL25 Protein of Herpes Simplex Virus That Are Required for Its Stable Interaction with Capsids. *J. Virol.* **2011**, *85*, 4875–4887. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
57. DeRussy, B.M.; Boland, M.T.; Tandon, R. Human Cytomegalovirus PUL93 Links Nucleocapsid Maturation and Nuclear Egress. *J. Virol.* **2016**. [[CrossRef](#)]
58. Huet, A.; Huffman, J.B.; Conway, J.F.; Homa, F.L. Role of the Herpes Simplex Virus CVSC Proteins at the Capsid Portal Vertex. *J. Virol.* **2020**, *94*, e01534-20. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
59. Heming, J.D.; Conway, J.F.; Homa, F.L. Herpesvirus Capsid Assembly and DNA Packaging. *Adv. Anat. Embryol. Cell Biol.* **2017**, *223*, 119–142. [[CrossRef](#)]
60. Zhang, Y.; Liu, W.; Li, Z.; Kumar, V.; Alvarez-Cabrera, A.L.; Leibovitch, E.C.; Cui, Y.; Mei, Y.; Bi, G.-Q.; Jacobson, S.; et al. Atomic Structure of the Human Herpesvirus 6B Capsid and Capsid-Associated Tegument Complexes. *Nat. Commun.* **2019**, *10*. [[CrossRef](#)]
61. Tandon, R.; MocarSKI, E.S.; Conway, J.F. The A, B, Cs of Herpesvirus Capsids. *Viruses* **2015**, *7*, 899–914. [[CrossRef](#)]
62. Townsend, L.B.; Turk, S.R.; Nassiri, M.R.; Drach, J.C. Design, Synthesis, and Antiviral Activity of Certain 2,5,6-Trihalo-1-(beta-D-ribofuranosyl) benzimidazoles. *J. Med. Chem.* **1995**, *38*, 4098–4105. [[CrossRef](#)]
63. Emery, V.C.; Hassan-Walker, A.F. Focus on New Drugs in Development Against Human Cytomegalovirus. *Drugs* **2002**, *62*, 1853–1858. [[CrossRef](#)]
64. Underwood, M.R.; Ferris, R.G.; Selleseth, D.W.; Davis, M.G.; Drach, J.C.; Townsend, L.B.; Biron, K.K.; Boyd, F.L. Mechanism of Action of the Ribopyranoside Benzimidazole GW275175X against Human Cytomegalovirus. *Antimicrob. Agents Chemother.* **2004**, *48*, 1647–1651. [[CrossRef](#)]
65. Reefsclaeger, J. Novel Non-Nucleoside Inhibitors of Cytomegaloviruses (BAY 38-4766): In Vitro and in Vivo Antiviral Activity and Mechanism of Action. *J. Antimicrob. Chemother.* **2001**, *48*, 757–767. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
66. Kornfeind, E.M.; Visalli, R.J. Human Herpesvirus Portal Proteins: Structure, Function, and Antiviral Prospects. *Rev. Med. Virol.* **2018**, *28*, e1972. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
67. Chemaly, R.F.; Ullmann, A.J.; Stoelben, S.; Richard, M.P.; Bornhäuser, M.; Groth, C.; Einsele, H.; Silverman, M.; Mullane, K.M.; Brown, J.; et al. Letermovir for Cytomegalovirus Prophylaxis in Hematopoietic-Cell Transplantation. *N. Engl. J. Med.* **2014**, *370*, 1781–1789. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
68. Marty, F.M.; Ljungman, P.; Chemaly, R.F.; Maertens, J.; Dadwal, S.S.; Duarte, R.F.; Haider, S.; Ullmann, A.J.; Katayama, Y.; Brown, J.; et al. Letermovir Prophylaxis for Cytomegalovirus in Hematopoietic-Cell Transplantation. *N. Engl. J. Med.* **2017**. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
69. Goldner, T.; Hempel, C.; Ruebsamen-Schaeff, H.; Zimmermann, H.; Lischka, P. Geno- and Phenotypic Characterization of Human Cytomegalovirus Mutants Selected in Vitro after Letermovir (AIC246) Exposure. *Antimicrob. Agents Chemother.* **2014**, *58*, 610–613. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
70. Chou, S. Rapid in Vitro Evolution of Human Cytomegalovirus UL56 Mutations That Confer Letermovir Resistance. *Antimicrob. Agents Chemother.* **2015**. [[CrossRef](#)]

71. Chou, S. A Third Component of the Human Cytomegalovirus Terminase Complex Is Involved in Letermovir Resistance. *Antiviral Res.* **2017**, *148*, 1–4. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
72. Chou, S. Comparison of Cytomegalovirus Terminase Gene Mutations Selected after Exposure to Three Distinct Inhibitor Compounds. *Antimicrob. Agents Chemother.* **2017**. [[CrossRef](#)]

Annexe 3. Revue : Le complexe terminase, une cible de choix dans le traitement de l'infection à cytomégalo­virus humain



médecine/sciences 2020 ; 36 : 000-0

> Le cytomégalo­virus humain (CMVH) est un pathogène opportuniste majeur en cas d'immuno­dépression et représente la principale cause d'infection congénitale d'origine virale. Bien qu'efficaces, l'utilisation des molécules conventionnelles est limitée par leur toxicité et par l'émergence de résistance du virus, rendant nécessaire le développement de nouveaux traitements. Lors de la réplication du CMVH, l'encapsidation de l'ADN est réalisée par le complexe terminase qui clive l'ADN pour empaqueter le génome dans la capsid. L'absence d'homologues dans les cellules de mammifère rend les protéines du complexe terminase des cibles idéales pour des antiviraux spécifiques. Une nouvelle molécule, le letermovir, cible une étape exclusivement virale en interagissant avec le complexe terminase. Son efficacité a été prouvée lors d'essais cliniques de phase III. Néanmoins, son mécanisme d'action n'est, à ce jour, pas élucidé et aucune activité n'est observée contre les autres herpesvirus. <

Les traitements actuels de l'infection à cytomégalo­virus et l'émergence de résistance

Le cytomégalo­virus (CMVH) est un bêta-herpesvirus ubiquitaire infectant 50 à 100 % de la population mondiale, la prévalence variant en fonction du niveau socio-économique. La primo-infection, souvent asymptomatique chez les personnes immuno­compétentes, est suivie d'une phase de latence au cours de laquelle peuvent survenir des réactivations. Le CMVH représente l'agent pathogène le plus fréquemment rencontré en transplantation : 50 à 70 % des patients présentent une primo-infection ou une réactivation dans l'année qui suit la greffe [1,2]. Il est également la première cause d'infection congénitale virale dans le monde. Alors que dans les pays industrialisés la prévalence est comprise entre 0,3 et 1,2 %, elle est plus difficile à évaluer dans les

Le complexe terminase, une cible de choix dans le traitement de l'infection à cytomégalo­virus humain

Gaëtan Ligat^{1,2,*}, Clotilde Muller^{1,2}, Sophie Alain^{1,2}, Sébastien Hantz^{1,2}

¹Univ. Limoges, Inserm, CHU Limoges, RESINFIT, U1092, F-87000 Limoges, France.

²CHU Limoges, Laboratoire de bactériologie-virologie-hygiène, Centre national de référence des Herpesvirus (NRCHV), F-87000 Limoges, France.

*Adresse actuelle : Inserm U1110, Institut de Recherche sur les Maladies Virales et Hépatiques, Université de Strasbourg, 3 rue Koeberlé, 67000 Strasbourg, France. gligat@unistra.fr

pays en développement. Néanmoins, on estime que 1 % des enfants dans le monde sont infectés par le CMVH *in utero*.

Les antiviraux actuellement disponibles en pratique clinique sont peu nombreux. Le ganciclovir (GCV), et sa prodrogue orale le valganciclovir (VGCV), le cidofovir (CDV) et le foscarnet (FOS) inhibent l'activité de l'ADN polymérase virale pUL54 (Figure 1). Bien qu'efficaces, ces molécules présentent une toxicité hématologique et/ou rénale, et sont à l'origine de l'émergence de mutations de résistance [3]. De par leur toxicité, leur utilisation est contre-indiquée chez la femme enceinte. L'aciclovir (ACV) ou sa prodrogue orale le valaciclovir (VACV), ciblent également l'ADN polymérase virale. Ils peuvent être utilisés chez les transplantés, mais uniquement en prophylaxie en raison de leur faible efficacité sur le virus, ou en cas d'infection congénitale, du fait de leur absence de toxicité [4].

De nouvelles molécules présentant une meilleure biodisponibilité orale et une moindre toxicité sont en cours de développement. Le letermovir (ou PREVMISTM) a reçu en novembre 2017 l'approbation de l'Europe et des États-Unis pour une utilisation en prophylaxie dans le cadre de greffes de cellules souches hématopoïétiques. Cette molécule cible une étape exclusivement virale, l'encapsidation du génome (Figure 1).

m/s n° 4, vol. 36, avril 2020
<https://doi.org/10.1051/medsci/2020063>

REVUES



SYNTHÈSE

1

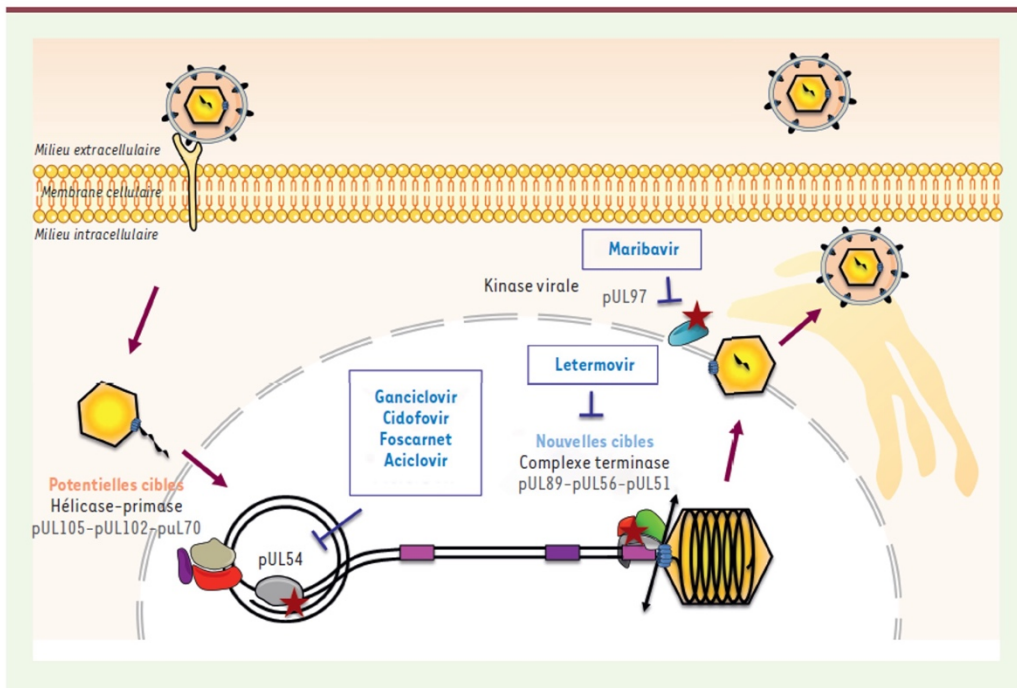


Figure 1. Cycle de réplication du CMVH et site d'action des molécules antivirales. Après l'attachement du virus à la cellule, la fusion des membranes cellulaires et virales aboutit à la pénétration du virus qui est transporté via le réseau des microtubules jusqu'au noyau où l'ADN viral est libéré et circularisé. La réplication, selon le modèle du cercle roulant, dépend de plusieurs protéines et plus particulièrement du complexe hélicase-primase (pUL105-pUL102-pUL70) et de l'ADN polymérase pUL54. pUL56, pUL89 et pUL51, formant un hétéro-oligomère nommé complexe terminase, participent à l'encapsidation du génome viral. La sortie du virion ainsi formé nécessite la kinase virale pUL97. Il est transporté dans le cytoplasme via le réseau des microtubules permettant sa maturation et son enveloppement dans l'appareil de Golgi avant son excréation. Les antiviraux actuels (ganciclovir, cidofovir, foscarnet et aciclovir) interfèrent avec l'activité de la polymérase virale pUL54. Le maribavir a pour cible la kinase virale pUL97 et le letermovir agit sur l'étape d'encapsidation du génome virale en interagissant avec le complexe terminase. Les mutations de résistance sont signalées avec une étoile.

Le complexe terminase : des protéines indispensables à l'étape d'encapsidation

La réplication du génome du CMVH aboutit à la formation de concatémères d'ADN qui agissent comme substrat lors du processus d'encapsidation (Figure 1). Un complexe de protéines virales, appelé « complexe terminase », permet la reconnaissance, le clivage et la translocation des unités de génome dans des capsides néoformées [5]. Le génome du CMVH comporte, à ses extrémités et en son centre, des séquences répétées, appelées séquences « a », qui contiennent des éléments *cis*-régulateurs (« *pac* » ou « *cis-acting packaging element* »). Le processus d'encapsidation implique un clivage site-spécifique au niveau de séquences riches en AT des éléments « *pac* ». Le complexe terminase, hétéro-oligomérique, est constitué des sous-unités pUL56, pUL89 et pUL51 [6,7]. D'autres protéines, pUL52, pUL77

et pUL93, ont également été identifiées comme des partenaires du complexe [8-12]. Après sa translocation dans le noyau, le complexe terminase reconnaît les séquences « *pac* », effectue un premier clivage de l'ADN viral, et recrute une capside vide. Il réalise alors un second clivage libérant l'ADN viral dans la capside via une interaction avec les protéines pUL104. Le complexe se dissocie finalement, permettant une nouvelle encapsidation [13].

La grande sous-unité pUL56

pUL56, aussi nommée grande sous-unité du complexe terminase, est une protéine de 850 acides aminés codée par un gène de 2 553 paires de bases (pb) situé dans le segment unique long du génome du virus. D'environ

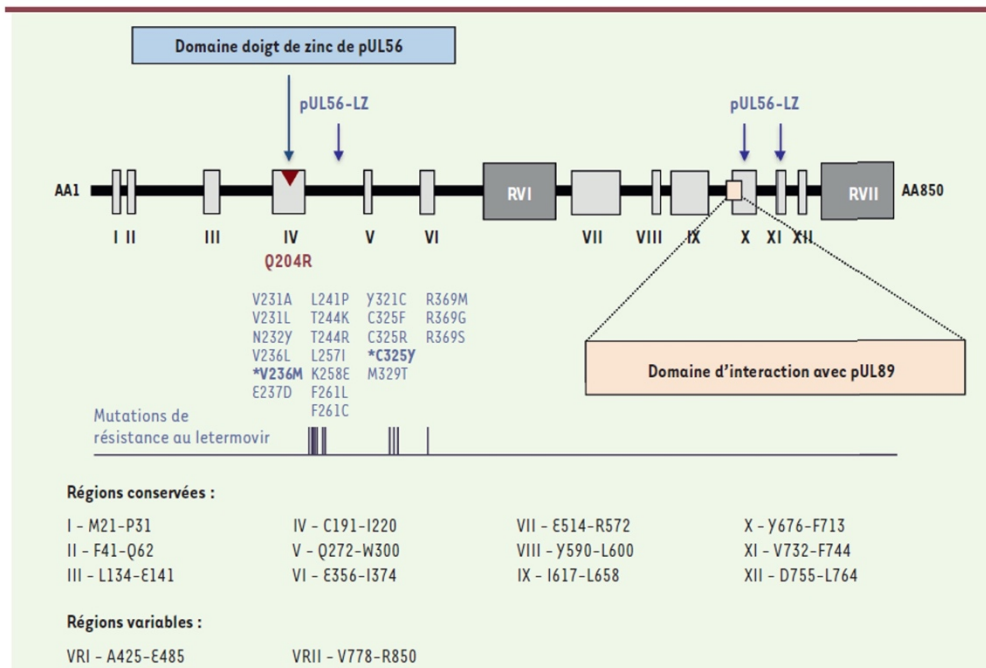


Figure 2. Régions conservées de la sous-unité pUL56. pUL56 est composé de 12 régions conservées (I-XII). La région conservée IV représente un domaine doigt de zinc (DZ). La partie centrale de pUL56 et l'extrémité C-terminale comprennent deux régions variables annotées RGI et RGII. Les trois « Leucine zipper », annotées pUL56-LZ, sont indiquées. La séquence située en C-terminale de pUL56 (₆₇₁WMVVKYMGFF₆₈₀), essentielle pour l'interaction avec pUL89, est indiquée. Les positions des acides aminés associés à la résistance *in vitro* au letermovir sont spécifiées [35, 36]. Les mutations de résistance identifiées lors d'études cliniques sont signalées en gras avec une étoile (www.accessdata.fda.gov, Reference ID 4179078). La position de la mutation de résistance au benzimidazole (Q204R) est indiquée en rouge (adaptée de [33]).

130 kDa, elle est constituée de 12 régions conservées (Figure 2) [14]. pUL56 est hautement conservée. Elle a été identifiée et caractérisée en partie grâce à son homologie avec la protéine pUL28 d'HSV-1 (herpes simplex 1) [15,16]. Elle présente la capacité à s'auto-dimériser [17]. pUL56 est impliquée, notamment, dans l'activité ATPase du complexe terminase et la reconnaissance de motifs cis-régulateurs « pac », nécessaire au clivage des concatémères d'ADN, produit de la réplication virale [18]. Bogner et ses collaborateurs ont en effet mis en évidence l'interaction spécifique de pUL56 avec des motifs « pac » [19]. Le processus d'encapsidation de l'ADN viral est initié dans des structures nucléaires appelées « centres de réplication », dans lesquelles pUL56 s'accumule tardivement après l'infection, et s'associe aux protéines pUL112, pUL113 et pUL44, trois protéines impliquées dans la réplication virale. L'importation de pUL56 dans le noyau est réalisée par une voie importine, par l'interaction de la protéine hSRP1a¹ avec le signal de localisation nucléaire (NLS) situé

dans la partie C-terminale de pUL56 (résidus d'acides aminés 816 à 827). Une analyse mutationnelle a permis de préciser que l'arginine 822 et la lysine 823 étaient les résidus essentiels du signal de localisation de pUL56 [20]. Contrairement à pUL56 qui peut se localiser seule dans le noyau, les sous-unités pUL89 et de pUL51 nécessite la présence simultanée des trois sous-unités du complexe (pUL56, pUL89, pUL51) pour leur translocation nucléaire [21]. Une interaction spécifique entre la partie C-terminale de pUL56 et pUL89 a d'ailleurs été mise en évidence par co-immunoprécipitation [22] et nous avons montré qu'une courte séquence de dix résidus localisés dans la région C-terminale de pUL56 (₆₇₁WMVVKYMGFF₆₈₀) était essentielle pour cette interaction [23]. pUL89 réalise la première étape du clivage de l'ADN concatémère qui est suivie de la liaison du complexe terminase aux séquences « pac ». Lors du processus d'encapsidation de l'ADN, pUL56 interagit également avec la protéine

¹ Protéine reconnaissant le signal de translocation nucléaire et permettant à la protéine exprimant ce signal de pénétrer dans le noyau.



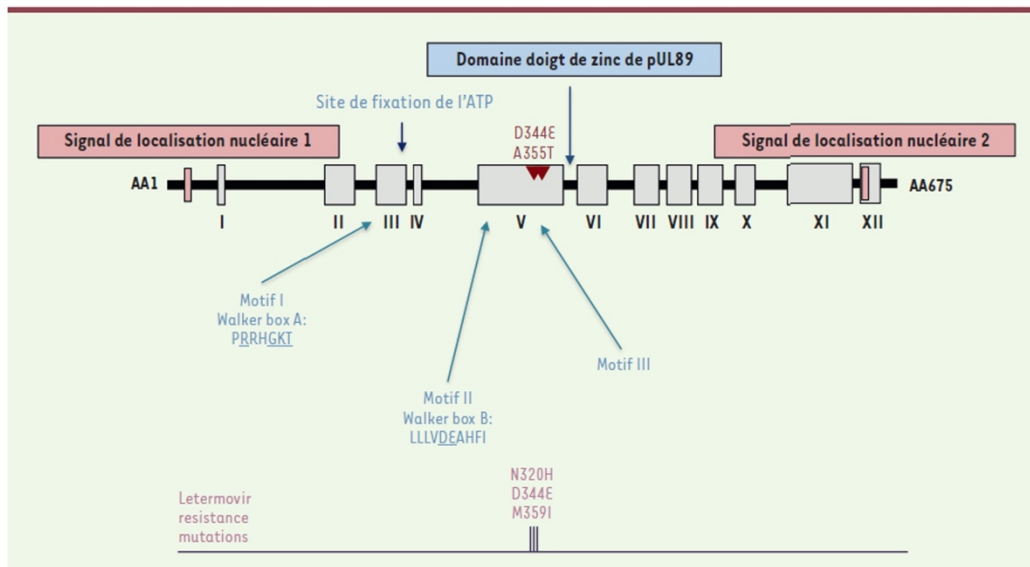


Figure 3. Régions conservées de la sous-unité pUL89. pUL89 est composé de 12 régions conservées (I-XII) avec plusieurs domaines fonctionnels hypothétiques, tels que le site de localisation nucléaire (NLS-1 et NLS-2), un doigt de zinc et un site de liaison à l'ATP. Les acides aminés soulignés sont des résidus impliqués dans les activités des domaines. Les positions des acides aminés associées à la résistance *in vitro* au letermovir sont indiquées. La position des mutations de résistance au benzimidazole (D344E et A355T) est indiquée en rouge (adaptée de [33]).

portail² pUL104 via sa partie C-terminale. L'activité du complexe dépend de l'hydrolyse de l'ATP qui implique uniquement pUL56 [18] et une mutagenèse dirigée sur le site de liaison de l'ATP de pUL56 (₇₀₉YNETFGKQ₇₁₆) a montré que la glycine 714 et la lysine 715 étaient essentielles pour cette activité [24].

pUL56 appartiendrait à la famille des « LAGLIDADG homing endonuclease » (LHE). Nous avons en effet mis en évidence dans la partie N-terminale de la protéine, un motif LATLNDIERFL se rapprochant du motif LAGLIDADG des LHE, et un motif de liaison à l'ADN (doigt de zinc). Par mutagenèse dirigée, nous avons caractérisé les acides aminés potentiellement impliqués dans la dimérisation de pUL56 et dans son activité nucléase, nécessaire au clivage des concatémères d'ADN, et activités essentielles à la réplication virale [25]. Bien que pUL56 soit la protéine présentant le plus grand nombre de fonctions et de zones d'interactions parmi les protéines du complexe, peu de données sont disponibles quant à son interaction avec les autres protéines du complexe et aucune structure cristalline n'a pu être obtenue. Cette absence de données structurales limite ainsi le développement de nouveaux antiviraux.

² L'encapsulation nécessite la formation de canaux dans la capsid virale. Ces canaux sont réalisés par des protéines virales appelées protéines portail.

La petite sous-unité pUL89

La petite sous-unité du complexe terminase du CMVH, la protéine pUL89, est une protéine de 674 acides aminés codée par un gène de 2 025 pb situé dans le segment unique long du génome du CMVH. Différents motifs conservés ont été mis en évidence *in silico* (Figure 3). On retrouve notamment un motif de fixation de l'ATP (₁₅₆EPFQ₁₅₉), un motif de type « Walker A » ou motif I (₂₁₃PRRHGKT₂₁₉), un motif de type « Walker B » ou motif II (₃₀₅LLLVD₃₁₄EAHFI), et le motif III (₃₃₇SST₃₃₉) [26]. Aucune réelle activité enzymatique n'a été mise en évidence pour pUL89. Néanmoins, il a été montré en 2002 que pUL89 augmentait l'activité ATPasique de pUL56 lors de la formation du complexe [18]. La séquence de vingt acides aminés ₅₈₀GRDKALAVEQFISR-FNSGYIK₆₀₀ située dans la partie C-terminale de pUL89 serait suffisante pour son interaction avec pUL56 [22]. La structure de ce court domaine a été résolue sous forme d'une hélice alpha exposée [27].

La structure cristalline de la région C-terminale de pUL89 a également permis d'identifier trois résidus conservés (Lysine 583, Alanine 586 et Asparagine 595), participant probablement au domaine d'interaction entre pUL89 et pUL56 [28]. Bien qu'aucune preuve expérimentale n'ait été obtenue, deux domaines NLS

putatifs ont été proposés pour permettre la translocation nucléaire de pUL89 [26]. Néanmoins, pUL89 ne pourrait rejoindre le noyau qu'associée à pUL56 [29].

La sous-unité pUL51

La protéine pUL51, composée de 157 acides aminés codée par un gène de 474 pb situé dans le segment unique long du génome de CMVH, a été récemment identifiée comme étant un partenaire de pUL56 et pUL89, nécessaire au clivage de l'ADN viral [7,21]. pUL51, par son extrémité C-terminale, interagit avec les sous-unités pUL56 et pUL89 et assure leur localisation nucléaire [30]. L'association des sous-unités pUL56 et pUL89 à pUL51, constituant le complexe terminase entièrement assemblé, protège de sa dégradation par le protéasome de la cellule hôte [21]. Peu de données sont, à ce jour, disponibles sur pUL51 et aucune structure cristalline n'a été obtenue.

Les partenaires du complexe terminase récemment identifiés

L'étape d'encapsidation du génome virale semble impliquer davantage de protéines que les sous-unités pUL56, pUL89 et pUL51. Au moins trois protéines supplémentaires, pUL52, pUL77 et pUL93, participerait également au processus. pUL52 est ainsi nécessaire pour le clivage des concatémères d'ADN, mais elle n'intervient pas pour la localisation nucléaire des sous-unités du complexe terminase [31]. pUL93 interagit avec pUL77 et les composants du complexe de sortie nucléaire, pUL50, pUL53 et pUL97. Un rôle essentiel de ces protéines dans l'étape d'encapsidation du génome du CMVH est supposé mais leurs fonctions biologiques restent mal caractérisées et leur structure tridimensionnelle n'a pas encore été résolue.

Le complexe terminase : nouvelle cible thérapeutique et développement du letermovir

L'intérêt grandissant pour le complexe terminase s'explique par ses caractéristiques qui en font une cible virale de choix. En effet, ce complexe hétéro-oligomérique indispensable à la réplication virale ne présente pas d'homologues dans les cellules. De plus, ses différentes fonctions enzymatiques représentent une multitude de cibles potentielles pour de futures molécules antivirales [33]. Outre l'induction de changements de conformation affectant l'orientation du complexe, l'inhibition directe de l'interaction entre les différentes sous-unités ou la protéine portail pUL104 peut être envisagée. D'autres voies peuvent également être explorées, comme l'inhibition de l'activité nucléase ou la liaison de l'ATP à pUL56.

Le letermovir, une molécule de la classe des quinazolines, cible l'encapsidation du génome viral en interagissant avec les protéines du complexe terminase [34]. Les données précliniques obtenues pour cette molécule révèlent sa très forte activité antivirale et, comparée aux autres molécules antivirales, une faible toxicité [35]. Les essais cliniques de phase I et II ont confirmé ces données précliniques [36] : la molécule est bien tolérée et sans effet secondaire notable. Comparé à un placebo, le letermovir présente une forte activité prophylactique chez les receveurs de greffes de cellules souches hématopoïétiques.

La réduction de l'incidence de l'infection dépend de la dose utilisée, la dose maximale (480 mg) montrant la meilleure efficacité [37].

Malgré l'efficacité de cette molécule, la possibilité de l'émergence de résistance a été démontrée *in vitro*. Les premières mutations du virus observées en réponse au letermovir ont été localisées dans la partie N-terminale de pUL56, à proximité du potentiel motif doigt de zinc [38,39]. Des mutations de pUL89 (D344E, N320H et M359I) ont également été identifiées, conférant une faible résistance du virus au letermovir [40]. De même, une potentielle mutation (P91S) de résistance a été détectée *in vitro* au sein de pUL51 [41]. La caractérisation phénotypique du virus muté a confirmé que cette mutation conférait, à elle seule, une résistance au letermovir 2,4 fois supérieure par rapport à la souche de référence et, lorsque combinée avec des mutations de pUL56 (S229F ou R369M), multipliait par 3 à 6 le niveau de résistance. Lors de l'essai clinique de phase III, certaines mutations affectant les trois sous-unités principales du complexe terminase (pUL56, pUL89, pUL51) ont été détectées chez des patients ne répondant pas au letermovir [42,43], suggérant que le letermovir inhibe une fonction biologique nécessitant l'interaction des trois sous-unités, telle que la fixation aux séquences « *pac* », le clivage ou la translocation d'une unité de génome dans une pro-capside. En raison des connaissances limitées sur la structure des protéines du complexe terminase, déterminer si les mutations de résistance que l'on observe dans les trois gènes codant les sous-unités correspondent à des sites d'interaction avec le letermovir, reste difficile.

Vers une meilleure compréhension du mécanisme d'action du letermovir

Contrairement à d'autres inhibiteurs de l'encapsidation du génome viral, le letermovir est spécifique du CMVH. L'absence d'effet vis-à-vis d'autres herpesvirus, qui se réactivent également chez les patients immunodéprimés, limite donc le spectre d'activité du letermovir en clinique [44]. Afin de mieux comprendre cette spécificité, nous avons étudié la localisation des mutations de résistance au letermovir liées aux domaines conservés de pUL56 identifiés par homologies [45]. L'impact potentiel des polymorphismes de pUL56 sur la sensibilité du virus au letermovir a récemment été étudié à partir d'un panel de 74 isolats cliniques [46]. La majorité des polymorphismes qui ont ainsi été identifiés est située dans les deux régions variables de pUL56 et aucun dans la région de résistance au letermovir (AA230 à AA370). Cela suggère fortement que

	231	261	321	329	363	375
ALPHAHERPES						
HHV_1	LDANE L RRYLPHAA G LSADADRARALS V LDHAL		AS N L T ALAR		QATSPD D QIEALI	
HHV_2	LDANE L RRYLPHAA G LSAARARALCVLDQAL		AD N LNALAQ		QATSPD D QIEALI	
CeHV_1	LDDNELRKNLPYAGGFSEARARALRVLDQAL		AD N LTELAR		QATSPEDQIEALI	
CeHV_2	VDEDDLKKNLPYAGGHAPQRLNALCEDLRHAR		GRRLADLEE		PRLPPE T R M VALI	
EHV_1	VANIDIARYLPHASGVASERRAAAEALRALE		TENLETLDK		CAVSPDDHIEALI	
GaHV_3	VHPDDMVAHIPHAACLSDEKRSVVQAALSLIR		AD N LEDLAF		RAVAPDDIIEALI	
MeHV_1	VDPDDMVAHLPHATYILPKLAVATTALNHIN		AD N LEQVVA		RTAAPDDIIEALI	
HHV_3	V D V D D I IRCLPYI D V P DIK R QSAVEALRTLQ		V D N L D V L N E		RSSSPD S QIEALI	
SUID	VDPED AKNLPHVHGLDEARRGRALAALA A AVD		THNLDDLER		CAAS P DERLEALI	
GaHV_1	VSTDDLKRHLPLR D V D PEKLN V LSNETRIE		DKDLSEL F K		LATSPDTEIAALI	
GaHV_2	VNSDDL L THLPHA YVPDDKRTTAQTALDVIQ		AD N LEALVS		RAAAPDDIIEALI	
BETAHERPES						
AD169	VNIQT V EQDL L DI T TRIPHLA-GVLSA K KS L F		V H Q L C R AL V		VFAAPN S IIDLIT	
HHV_6_B	KN I ETIEKDLGEA I LN Y GTIQ-SV V TEIKKIF		CH T LYKQLQ		IYVSPSRLIDLIT	
HHV_6_A_GS	KN I ETIEKDLGEA I LN Y GTIVQ-SV V TEIKKIF		CH T LYKQLQ		TYSSPKNSIYLKS	
CCMV	MDAQAVEQDMGDI A IRAPSVK-GI I RAIKSLA		SHSLWK T LR		IFAAPGKVVDMIT	
RhCMV	MDAQAVEQDMGDI A IRAPSVK-GI I RAIKSLF		YHHL C RVLM		VFAAPSRIIDLIT	
MCMV	MDAQAVEQDMGDI A IRAPSVK-GI I RAIKSLA		SHSLWK T LR		IFAAPGKVVDMIT	
RCMV	MDAQAVEQDMGDI A IRAPRVK-SI I RS L KNLA		SHGLWK A LR		ISAAPGKVVDMIT	
GAMMAHERPES						
HHV_8	G---LFENELKQLGLQTPESI-----PTTPCQ		CSHLASLFT		LFSSVEDTIESLQ	
HHV_4_1	G---LFENEVRQAGLGHLLAEAEKARPGGPEE		HSR S L S A L F A		VYSSSGDAVEALK	
HHV_4_2	G---LFENEVRQAGLGHLLAEAEKARPGGPEE		HSR S L S A L F A		VYSSSGDAVEALK	

Région VI - E356-I374

Figure 4. Aligement des séquences de la région conservée pUL56 VI de 21 herpèsvirus. La numérotation des séquences est conforme à celle des résidus de la souche de référence AD169. Les résidus de CMVH impliqués dans la résistance au letermovir sont représentés par des lettres blanches sur un fond noir. Les résidus des virus testés avec le letermovir sont représentés par des lettres noires sur fond gris.

tous les résidus connus pour être associés à une résistance au letermovir sont fortement conservés, sans toutefois être toujours situés dans des domaines conservés de la protéine. La substitution de l'arginine 369 (R369M/G/S) qui confère une résistance de haut niveau au letermovir, est située dans la région conservée VI de la protéine virale [47]. Ce résidu n'a cependant été retrouvé que dans la protéine du CMVH et de l'HHV-6_B (Figure 4). Chez d'autres herpèsvirus, cette arginine est substituée par un aspartate (HSV-1, HSV-2, HHV-4_1 et HHV-4_2), une asparagine (HHV-6A-GS), une sérine (HHV-3), ou une lysine (MCMV et RCMV). Ces substitutions différentes pourraient expliquer le manque d'efficacité du letermovir pour ces herpèsvirus. Contrairement à d'autres herpèsvirus, HHV-6_B possède également une arginine en position 369 mais la sensibilité de ce virus au letermovir n'a pas été testée. Le manque d'activité du letermovir associé à la substitution de la sérine peut résulter de la différence de taille de cet acide aminé par rapport à celle de l'arginine. Pour l'aspartate, ce défaut reposerait sur la présence d'une charge négative. La présence d'une chaîne latérale plus courte peut également expliquer le manque d'activité que l'on observe dans le cas d'une substitution par l'arginine ou par l'asparagine. Pour mieux comprendre l'impact de l'acide aminé R369 sur l'interaction potentielle de la pro-

téine virale avec le letermovir, nous avons construit un modèle théorique du petit fragment (résidus 224 à 450, région VI comprise) à l'aide du serveur CPHmodels-3.2 (Figure 5). L'acide aminé R369 (en rouge dans la figure) est situé dans une boucle. Les analyses de la région riche en leucine proche de cette boucle ont permis de prédire l'existence de deux hélices alpha qui pourraient constituer un « leucine zipper ». Les leucines sont conservées au sein de bêta-herpèsvirus ou substituées par une isoleucine ou une valine. Le mécanisme d'action du letermovir pourrait reposer sur son interaction avec plusieurs résidus situés dans la boucle (Figure 5). La plupart des résidus impliqués dans la résistance du letermovir ont été retrouvés chez d'autres herpèsvirus, tels que l'HSV-1 ou HSV-2. Par exemple, la substitution touchant la leucine 241 (L241P chez le CMVH) a également été identifiée chez tous les alpha-herpèsvirus. Cette leucine est substituée par une glycine chez d'autres beta-herpèsvirus. Il pourrait être intéressant d'étudier la capacité relative d'émergence de ces mutations dans un contexte

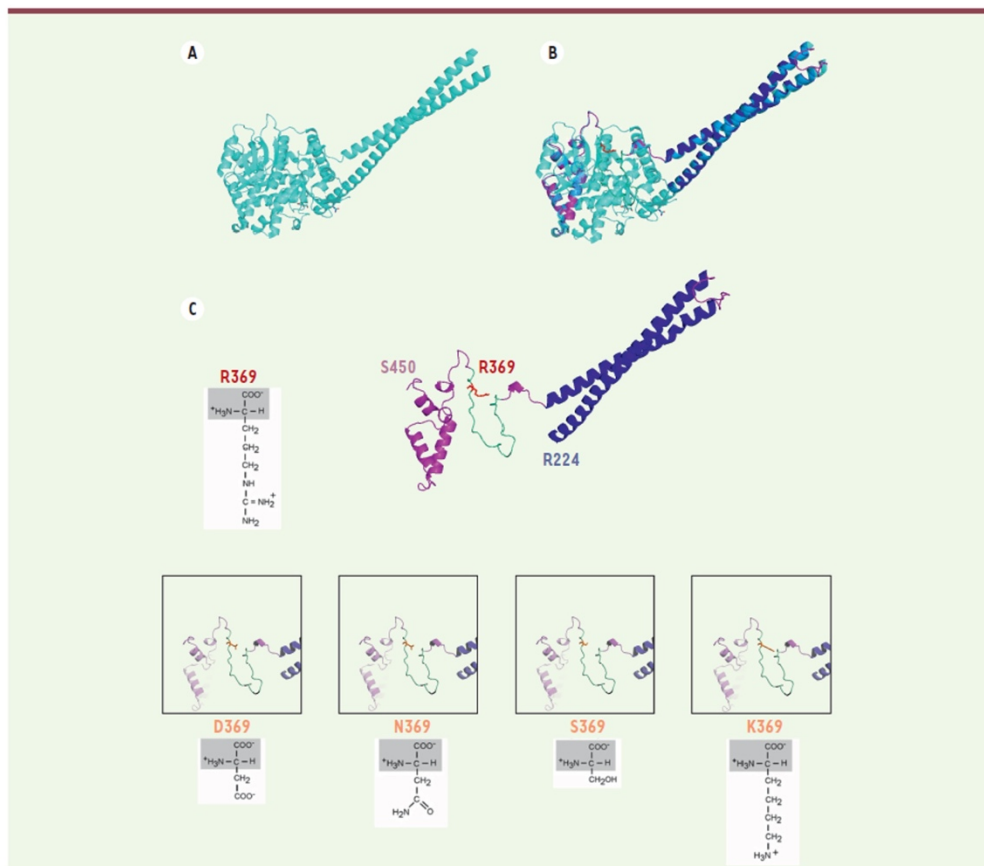


Figure 5. Modélisation par homologie d'un segment de pUL56 (résidus 224 à 450) mettant en évidence le rôle du résidu R369 dans le mécanisme d'action du letermovir. **A.** Structure de la moésine de *Spodoptera frugiperda* (PDB : 211K.A). **B.** Superposition de la structure de la moésine de *Spodoptera frugiperda* et de la structure théorique de pUL56(224-450). **C.** Structure théorique de pUL56(224-450) obtenue grâce au serveur CPH-models-3.2. Le résidu R369 sur la boucle (en vert) est représenté en rouge sur le modèle théorique. Deux hélices alpha représentant une structure « Leucine zipper » sont représentées en bleu.

clinique. Ces mutations existant chez d'autres herpèsvirus, elles pourraient représenter un avantage et seraient sélectionnées lors de la réplication virale en contexte clinique. La divergence des séquences protéiques, et donc la conformation des sous-unités du complexe terminase, pourraient probablement expliquer la spécificité du letermovir pour le CMVH.

Nouvelles cibles thérapeutiques et nouveaux antiviraux

À côté des inhibiteurs de l'encapsidation, de nouveaux antiviraux sont en cours de développement afin de pallier la toxicité des traitements disponibles et l'émergence de mutations de résistance. De

nombreuses voies sont explorées : des inhibiteurs de la polymérase pUL54 ou des molécules ciblant des voies de la réplication cellulaire interférant avec la réplication virale (artésunate et dérivés, maribavir). Parmi les inhibiteurs de la polymérase, le brincidofovir est un prodrogue du cidofovir conjugué à un lipide afin d'améliorer sa biodisponibilité. Il a été proposé en prévention de la maladie à CMVH en essai clinique de phase III. Le bénéfice de son utilisation en thérapeutique lors d'infections résistantes au CMVH, a été récemment montré, bien que les mutations de résistance touchant le gène *UL54* puissent limiter son efficacité thérapeutique [48].

Le brincidofovir ne permet cependant pas de réduire significativement les infections/maladies à CMV chez les greffés de cellules souches hématopoïétiques. Il présente également des effets indésirables digestifs, ne permettant pas d'envisager son utilisation en clinique [49]. L'artésunate, un dérivé semi-synthétique de l'artémisine, est habituellement préconisé dans le traitement des accès palustres graves [50-52]. Il a été testé en prévention de la maladie à CMV mais son utilisation n'a pas été poursuivie en raison d'une efficacité médiocre sur la charge virale [53]. L'artésunate semble interférer avec la voie de signalisation impliquant NF- κ B (« nuclear factor- κ B ») en inhibant de la fixation de sa sous-unité RelA/p65 à l'ADN cellulaire [54]. Des dérivés de l'artésunate sont actuellement en phase pré-clinique [55].

Le maribavir³ est un dérivé benzimidazolé lévogyre du BDCRB⁴, qui cible la kinase virale pUL97. Il présente une faible toxicité et une bonne biodisponibilité [56]. Lors des premiers essais cliniques de phase III, son efficacité en prophylaxie à faibles doses n'a pas été démontrée [57]. Cependant son efficacité à forte dose en cas d'infection résistante aux anti-polymérase [58] a justifié la poursuite de son développement clinique [59].

De nouvelles cibles thérapeutiques ont été mises en évidence chez les alpha-herpesvirus : le complexe hélicase-primase ciblé par le pritelivir (HSV-1, HSV-2 et VZV) et l'amenamévir (HSV-1 et HSV-2). Ces molécules ne présentent cependant aucune activité contre le CMV, les domaines conservés de l'hélicase-primase du CMV présentant des différences significatives avec ceux des alpha-herpesvirus sensibles [60]. Ce complexe pourrait ainsi devenir une cible antivirale de choix pour le traitement de l'infection par le CMV.

Conclusion

Étudier la relation entre structure et fonction des protéines virales pourrait permettre de mieux appréhender le fonctionnement de complexes viraux impliqués dans le cycle de réplication du virus. Ces connaissances pourraient constituer un point de départ essentiel à l'identification de nouvelles cibles antivirales et, par conséquent, au développement de molécules à visée préventive, thérapeutique ou diagnostique. Elles permettraient également de mieux comprendre le mécanisme d'action de molécules en développement. \diamond

SUMMARY

The terminase complex, a relevant target for the treatment of HCMV infection

Human cytomegalovirus (HCMV) is an important ubiquitous opportunistic pathogen that belongs to the *betaherpesviridae*. Primary HCMV infection is generally asymptomatic in immunocompetent individuals. In contrast, HCMV infection causes serious disease in immunocompromised patients and is the leading cause of congenital viral infection. Although they are effective, using of conventional molecules is limited

by the emergence of resistance and their toxicity. New antivirals targeting other replication steps and inducing fewer adverse effects are therefore needed. During HCMV replication, DNA packaging is performed by the terminase complex, which cleaves DNA to package the genome into the capsid. With no counterpart in mammalian cells, these terminase proteins are ideal targets for highly specific antivirals. A new terminase inhibitor, letermovir, recently proved effective against HCMV in phase III clinical trials. However, the mechanism of action is unclear and it has no significant activity against other herpesvirus or non-human CMV. \diamond

LIENS D'INTÉRÊT

Les auteurs déclarent n'avoir aucun lien d'intérêt concernant les données publiées dans cet article.

RÉFÉRENCES

- Rubin RH. Prevention of cytomegalovirus infection in organ transplant recipients. *Transpl Infect Dis* 2000 ; 2 : 99-100.
- Pereyra F, Rubin RH. Prevention and treatment of cytomegalovirus infection in solid organ transplant recipients. *Curr Opin Infect Dis* 2004 ; 17 : 357-61.
- Andouard D, Mazon MC, Ligot G, et al. Contrasting effect of new HCMV pUL54 mutations on antiviral drug susceptibility: Benefits and limits of 3D analysis. *Antiviral Res* 2016 ; 129 : 115-9.
- Leruez-Ville M, Ghout I, Bussièrès L, et al. In utero treatment of congenital cytomegalovirus infection with valacyclovir in a multicenter, open-label, phase II study. *Am J Obstet Gynecol* 2016 ; 215 : 462.e1-e10.
- McVoy MA, Adler SP. Human cytomegalovirus DNA replicates after early circularization by concatemer formation, and inversion occurs within the concatemer. *J Virol* 1994 ; 68 : 1040-51.
- Scheffczyk H, Savva CGW, Holzenburg A, et al. The terminase subunits pUL56 and pUL89 of human cytomegalovirus are DNA-metabolizing proteins with toroidal structure. *Nucleic Acids Res* 2002 ; 30 : 1695-703.
- Borst EM, Kleine-Albers J, Gabaev I, et al. The human cytomegalovirus UL51 protein is essential for viral genome cleavage-packaging and interacts with the terminase subunits pUL56 and pUL89. *J Virol* 2013 ; 87 : 1720-32.
- Borst EM, Wagner K, Binz A, et al. The essential human cytomegalovirus gene UL52 is required for cleavage-packaging of the viral genome. *J Virol* 2008 ; 82 : 2065-78.
- Borst EM, Bauerfeind R, Binz A, et al. The Essential human cytomegalovirus proteins pUL77 and pUL93 are structural components necessary for viral genome encapsidation. *J Virol* 2016 ; 90 : 5860-75.
- DeRussy BM, Tandon R. Human cytomegalovirus pUL93 is required for viral genome cleavage and packaging. *J Virol* 2015 ; 89 : 12221-5.
- Köppen-Rung P, Dittmer A, Bogner E. Intracellular distributions of capsid-associated pUL77 of HCMV and interactions with packaging proteins and pUL93. *J Virol* 2016 ; 90 : 5876-85.
- DeRussy BM, Tandon R. Human cytomegalovirus pUL93 is required for viral genome cleavage and packaging. *J Virol* 2015 ; 89 : 12221-5.
- Bogner E. Human cytomegalovirus terminase as a target for antiviral chemotherapy. *Rev Med Virol* 2002 ; 12 : 115-27.
- Champier G, Couvreur A, Hantz S, et al. Putative functional domains of human cytomegalovirus pUL56 involved in dimerization and benzimidazole D-ribonucleoside activity. *Antivir Ther* 2008 ; 13 : 643-54.
- Addison C, Rixon FJ, Preston VG. Herpes simplex virus type 1 UL28 gene product is important for the formation of mature capsids. *J Gen Virol* 1990 ; 71 : 2377-84.
- Bogner E, Reschke M, Reis B, et al. Identification of the gene product encoded by ORF UL56 of the human cytomegalovirus genome. *Virology* 1993 ; 196 : 290-3.
- Savva CGW, Holzenburg A, Bogner E. Insights into the structure of human cytomegalovirus large terminase subunit pUL56. *FEBS Lett* 2004 ; 563 : 135-40.
- Hwang J-S, Bogner E. ATPase activity of the terminase subunit pUL56 of human cytomegalovirus. *J Biol Chem* 2002 ; 277 : 6943-8.

³ 2-isopropylamino-5,6-dichloro-1-(β -L-ribofuranosyl)benzimidazole.

⁴ 1-H- β -D-ribofuranoside-2-bromo-5,6-dichlorobenzimidazole.



RÉFÉRENCES

19. Bogner E, Radsak K, Stinski MF. The gene product of human cytomegalovirus open reading frame UL56 binds the pac motif and has specific nuclease activity. *J Virol* 1998 ; 72 : 2259-64.
20. Giesen K, Radsak K, Bogner E. Targeting of the gene product encoded by ORF UL56 of human cytomegalovirus into viral replication centers. *FEBS Lett* 2000 ; 471 : 215-8.
21. Neuber S, Wagner K, Goldne T, et al. Mutual interplay between the human cytomegalovirus terminase subunits pUL51, pUL56, and pUL89 promotes terminase complex formation. *J Virol* 2017 ; 91. pii: e02384-16.
22. Thoma C, Borst E, Messerle M, et al. Identification of the interaction domain of the small terminase subunit pUL89 with the large subunit pUL56 of human cytomegalovirus. *Biochemistry* 2006 ; 45 : 8855-63.
23. Ligot G, Jacquet C, Chou S, et al. Identification of a short sequence in the HCMV terminase pUL56 essential for interaction with pUL89 subunit. *Sci Rep* 2017 ; 7 : 8796.
24. Scholz B, Rechter S, Drach JC, et al. Identification of the ATP-binding site in the terminase subunit pUL56 of human cytomegalovirus. *Nucleic Acids Res* 2003 ; 31 : 1426-33.
25. Ligot G, Couvreur A, Cazol R, et al. Highlighting of a LAGLIDADG and a zing finger motifs located in the pUL56 sequence crucial for HCMV replication. *Viruses* 2019 ; 11.
26. Champier G, Hantz S, Couvreur A, et al. New functional domains of human cytomegalovirus pUL89 predicted by sequence analysis and three-dimensional modelling of the catalytic site DEXDc. *Antivir Ther* 2007 ; 12 : 217-32.
27. Couvreur A, Hantz S, Marquant R, et al. Insight into the structure of the pUL89 C-terminal domain of the human cytomegalovirus terminase complex. *Proteins* 2010 ; 78 : 1520-30.
28. Nadal M, Mas PJ, Blanco AG, et al. Structure and inhibition of herpesvirus DNA packaging terminase nuclease domain. *Proc Natl Acad Sci USA* 2010 ; 107 : 16078-83.
29. Wang JB, Zhu Y, McVoy MA, et al. Changes in subcellular localization reveal interactions between human cytomegalovirus terminase subunits. *J Virol* 2012 ; 9 : 315.
30. Neuber S, Wagner K, Messerle M, et al. The C-terminal part of the human cytomegalovirus terminase subunit pUL51 is central for terminase complex assembly. *J Gen Virol* 2017 ; 99 : 119-34.
31. Borst EM, Wagner K, Binz A, et al. The essential human cytomegalovirus gene UL52 is required for cleavage-packaging of the viral genome. *J Virol* 2008 ; 82 : 2065-78.
32. DeRussy BM, Boland MT, Tandon R. Human cytomegalovirus pUL93 links nucleocapsid maturation and nuclear egress. *J Virol* 2016 ; 90 : 7109-17.
33. Ligot G, Cazol R, Hantz S, et al. The human cytomegalovirus terminase complex as an antiviral target: a close-up view. *FEMS Microbiol Rev* 2018 ; 42 : 137-45.
34. Goldner T, Hewlett G, Ettischer N, et al. The novel anti-cytomegalovirus compound AIC246 (Letermovir) inhibits human cytomegalovirus replication through a specific antiviral mechanism that involves the viral terminase. *J Virol* 2011 ; 85 : 10884-93.
35. Lischka P, Hewlett G, Nunberg T, et al. In vitro and in vivo activities of the novel anti-cytomegalovirus compound AIC246. *Antimicrob. Agents Chemother* 2010 ; 54 : 1290-7.
36. Stoelben S, Arns W, Renders L, et al. Preemptive treatment of cytomegalovirus infection in kidney transplant recipients with letermovir: results of a phase 2a study. *Transplant* 2014 ; 27 : 77-86.
37. Chemaly RF, Ullmann AJ, Stoelben S, et al. Letermovir for cytomegalovirus prophylaxis in hematopoietic-cell transplantation. *N Engl J Med* 2014 ; 370 : 1781-9.
38. Piret J, Goyette N, Boivin G. Drug susceptibility and replicative capacity of multi-drug resistant recombinant human cytomegalovirus harboring mutations in UL56 and UL54 genes. *Antimicrob Agents Chemother* 2017 ; 61. pii: e01044-17.
39. Goldner T, Hempel C, Ruebsamen-Schaeff H, et al. Geno- and phenotypic characterization of human cytomegalovirus mutants selected in vitro after letermovir (AIC246) exposure. *Antimicrob. Agents Chemother* 2014 ; 58 : 610-3.
40. Chou S. Comparison of cytomegalovirus terminase gene mutations selected after exposure to three distinct inhibitor compounds. *Antimicrob Agents Chemother* 2017 ; 61.
41. Chou S. A third component of the human cytomegalovirus terminase complex is involved in letermovir resistance. *Antiviral Res* 2017 ; 148 : 1-4.
42. Komatsu TE, Hodowanec AC, Colberg-Poley AM, et al. In-depth genomic analyses identified novel letermovir resistance-associated substitutions in the cytomegalovirus UL56 and UL89 gene products. *Antiviral Res* 2019 ; 169 : 104549.
43. Douglas CM, Barnard R, Holder D, et al. Letermovir resistance analysis in a clinical trial of cytomegalovirus prophylaxis for hematopoietic stem cell transplant recipients. *J Infect Dis* 2019 ; pii: jiz577.
44. Marshall M, Stamminger T, Urban A, et al. In vitro evaluation of the activities of the novel anti-cytomegalovirus compound AIC246 (letermovir) against herpesviruses and other human pathogenic viruses. *Antimicrob. Agents Chemother* 2012 ; 56 : 1135-7.
45. Champier G, Couvreur A, Hantz S, et al. Putative functional domains of human cytomegalovirus pUL56 involved in dimerization and benzimidazole D-ribonucleoside activity. *Antivir Ther* 2008 ; 13 : 643-54.
46. Lischka P, Michel D, Zimmermann H. Characterization of cytomegalovirus breakthrough events in a letermovir (AIC246, MK 8228) phase 2 prophylaxis trial. *J Infect Dis* 2015 ; 213 : 23-30.
47. Goldner T, Hempel C, Ruebsamen-Schaeff H, et al. Geno- and phenotypic characterization of human cytomegalovirus mutants selected in vitro after letermovir (AIC246) exposure. *Antimicrob Agents Chemother* 2014 ; 58 : 610-3.
48. Vial R, Zandotti C, Alain S, et al. Brincidofovir use after foscarnet crystal nephropathy in a kidney transplant recipient with multidrug-resistant cytomegalovirus infection. *Case Rep Transplant* 2017 ; 2017 : 3624146.
49. Marty FM, Winston DJ, Chemaly RF, et al. A randomized, double-blind, placebo-controlled phase 3 trial of oral brincidofovir for cytomegalovirus prophylaxis in allogeneic hematopoietic cell transplantation. *Biol Blood Marrow Transplant* 2019 ; 25 : 369-81.
50. Kaptein SJF, Effertth T, Leis M, et al. The anti-malaria drug artesunate inhibits replication of cytomegalovirus in vitro and in vivo. *Antiviral Res* 2006 ; 69 : 60-9.
51. Chou S, Marousek G, Auerochs S, et al. The unique antiviral activity of artesunate is broadly effective against human cytomegaloviruses including therapy-resistant mutants. *Antiviral Res* 2011 ; 92 : 364-8.
52. Germler R, Mariette C, Alain S, et al. Success and failure of artesunate treatment in five transplant recipients with disease caused by drug-resistant cytomegalovirus. *Antiviral Res* 2014 ; 101 : 57-61.
53. Wolf DG, Shimoni A, Resnick IB, et al. Human cytomegalovirus kinetics following institution of artesunate after hematopoietic stem cell transplantation. *Antiviral Res* 2011 ; 90 : 183-6.
54. Lyss G, Knorre A, Schmidt TJ, et al. The anti-inflammatory sesquiterpene lactone helenalin inhibits the transcription factor NF-kappaB by directly targeting p65. *J Biol Chem* 1998 ; 273 : 33508-16.
55. Hutterer C, Niemann I, Milbradt J, et al. The broad-spectrum anti-infective drug artesunate interferes with the canonical nuclear factor kappa B (NF-kB) pathway by targeting RelA/p65. *Antiviral Res* 2015 ; 124 : 101-9.
56. Koszalka GW, Johnson NW, Good SS, et al. Preclinical and toxicology studies of 1263W94, a potent and selective inhibitor of human cytomegalovirus replication. *Antimicrob Agents Chemother* 2002 ; 46 : 2373-80.
57. Marty FM, Ljungman P, Papanicolaou GA, et al. 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* 2011 ; 11 : 284-92.
58. Alain S, Revest M, Veyer D, et al. Maribavir use in practice for cytomegalovirus infection in French transplantation centers. *Transplant Proc* 2013 ; 45 : 1603-7.
59. Papanicolaou GA, Silveira FP, Langston AA, et al. Maribavir for refractory or resistant cytomegalovirus infections in hematopoietic-cell or solid-organ transplant recipients: a randomized, dose-ranging, double-blind, phase 2 study. *Clin Infect Dis* 2019 ; 68 : 1255-64.
60. Ligot G, Da Re S, Alain S, et al. Identification of amino acids essential for viral replication in the HCMV helicase-primase complex. *Front Microbiol* 2018 ; 9 : 2483.

TIRÉS À PART
G. Ligot

Annexe 4. Article : Potentiel of anti-CMV immunoglobulin cytotect CP® *in vitro* and *ex vivo* in a first trimester placenta model



Article

Potential of Anti-CMV Immunoglobulin Cytotect CP® *In Vitro* and *Ex Vivo* in a First-Trimester Placenta Model

Perrine Coste Mazeau ^{1,2,3,4,*} , Chloé Jacquet ^{1,2,3} , Clotilde Muller ^{1,2} , Mathis Courant ² ,
Chahrazed El Hamel ⁵ , Thierry Chianea ⁶, Sébastien Hantz ^{1,2,3} and Sophie Alain ^{1,2,3,*}

- ¹ RESINFIT, UMR1092, University of Limoges, 2 Rue du Pr Descottes, 87000 Limoges, France; chloe.jacquet@umu.se (C.J.); clotilde.muller@unilim.fr (C.M.); sebastien.hantz@unilim.fr (S.H.)
 - ² National Institute of Health and Medical Research INSERM, UMR 1092, 2 Rue du Pr Descottes, 87000 Limoges, France; mathis.courant@unilim.fr
 - ³ National Reference Center for Herpesviruses, Virology Department, CHU Limoges, 2 Rue Martin Luther King, 87000 Limoges, France
 - ⁴ Gynecology and Obstetrics Department, CHU Limoges, 87000 Limoges, France
 - ⁵ Mother and Child Biobank (CB-HME), Pediatric Department, Hôpital de la Mere et de l'Enfant, CHU Limoges, 87000 Limoges, France; chahrazed.elhamel-belili@chu-limoges.fr
 - ⁶ Department of Biochemistry and Molecular Genetics, CHU Limoges, 87000 Limoges, France; thierry.chianea@chu-limoges.fr
- * Correspondence: perrine.coste-mazeau@unilim.fr (P.C.M.); sophie.alain@unilim.fr (S.A.); Tel.: +33-5-5505-6164 (P.C.M.); +33-5-5505-6724 (S.A.); Fax: +33-5-5505-6722 (P.C.M. & S.A.)

Abstract: Background: Congenital CMV infection is the leading cause of neonatal neurological deficit. We herein studied *in vitro* and *ex vivo* the potential of the hyperimmune globulin Cytotect CP® (Biotest, Germany) for congenital infection prevention and treatment. Methods: *In vitro* neutralization assays were conducted in fibroblasts and retinal epithelial cells on the CMV strains TB40/E and VHL/E to determine the 50% and 90% neutralizing doses (ND50 and ND90). The toxicity was assessed by measuring LDH release. *Ex vivo* assays were conducted in first-trimester villi explants with the TB40/E strain, namely, neutralization assays, the prevention of villi infection, and the inhibition of viral replication in infected villi. Viability was assessed by β -HCG quantification in supernatants. Results: The *in vitro* neutralization tests showed that Cytotect CP® inhibits the development of infection foci (DN50: 0.011–0.014 U/mL for VHL/E and 0.032–0.033 U/mL for TB40E) without any toxicity. In the *ex vivo* neutralization assays, the DN50 were 0.011 U/mL on day 7 and 0.093 U/mL on day 14. For the prevention of villi infection, the EC50 was 0.024 U/mL on day 7. Cytotect-CP® did not inhibit viral growth in infected villi. No impact on villi viability was observed. Conclusions: These results sustained that Cytotect CP® has the potential to prevent CMV congenital infection.

Keywords: congenital cytomegalovirus; hyperimmune immunoglobulins; Cytotect CP®



Citation: Coste Mazeau, P.; Jacquet, C.; Muller, C.; Courant, M.; El Hamel, C.; Chianea, T.; Hantz, S.; Alain, S. Potential of Anti-CMV Immunoglobulin Cytotect CP® *In Vitro* and *Ex Vivo* in a First-Trimester Placenta Model. *Microorganisms* 2022, 10, 694. <https://doi.org/10.3390/microorganisms10040694>

Academic Editor: Sherif T. S. Hassan

Received: 20 January 2022

Accepted: 19 March 2022

Published: 23 March 2022

Publisher's Note: MDPI stays neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.



Copyright: © 2022 by the authors. Licensee MDPI, Basel, Switzerland. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (<https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

1. Introduction

Humans are the only reservoir of human cytomegalovirus (HCMV), a virus of the *Herpesviridae* family. This virus makes use of multiple excretion routes, including saliva, urine, sexual secretions (semen and cervicovaginal secretions), and breast milk. Pregnancy, due to the induced immunodepression, and childbirth are situations with the risk of maternal infection and also of congenital infection. Even though the mechanism of CMV infection *in utero* is not entirely understood, some placental tissues, such as amniotic membrane, decidua, and villi, are known to support viral replication [1,2], and viral particles have been detected in epithelia of decidua endothelial glands and also in floating villi [3–5].

Congenital CMV infection (cCMV) is the leading cause of viral neonatal neurological deficit and non-genetic hearing loss [6,7] and is the most common viral congenital infection,

with an estimated birth prevalence of 0.2–6% in industrialized countries. Every year in France, 3400 children are born infected with CMV. The prevalence of primary CMV infection during pregnancy is about 1 to 2% in western Europe and the United States [7,8]. With a risk of 30% of maternal transmission in cases of CMV primary infection, the prevention of viral transmission to the fetus, particularly during the first trimester of pregnancy, is essential to avoid neurological sequelae in newborns.

Treatment during pregnancy may prevent maternal-fetal transmission or, in the case of a fetal infection, may prevent a developmental disorder. Several studies have focused on the efficacy of hyperimmunoglobulin (HIG) to prevent maternal-fetal transmission with disparate results [9–16]. Despite the interest of hyperimmune immunoglobulins in the preventive treatment of transplanted patients [17,18] and the efficacy of the molecule in the prevention of congenital CMV infection in published retrospective studies, anti-CMV antibodies (Cytogam[®] and Cytotect[®]) have not proven their efficacy in the only two randomized trials published to date on the subject [9,13]. Differences in the recruitment of subjects based on the time of seroconversion, HIG concentration, and frequency of treatment administration determine the efficacy [10,19]. A third phase III assay was recently launched to evaluate higher concentrations in early pregnancy with a new protocol of administration (NCT 05170269). Thus, understanding the HIG mechanism of action remains an important goal. Innate and adaptive immune responses could be mediated by the immunomodulatory effects of anti-CMV immunoglobulin (CMVIG) preparations that would also provide passive immunization [17] and could help to control some of the direct and indirect effects of CMV infection. However, these preparations are not necessarily identical in terms of avidity, neutralizing potential, specific anti-CMV IgG content, or immunomodulation. Although the effects of antibodies on HCMV transmission have been documented before, especially by Tabata et al. in their model of placental infection and prevention of infection by neutralizing monoclonal antibodies [20], the time of administration and the specific effect of HIG (Cytotect[®]) on HCMV infection at the placental level are not fully documented.

We, thus, aimed to characterize the potential of the hyperimmune globulin Cytotect CP[®] (Biotest, Germany) as a candidate for congenital infection prevention or treatment in our first trimester placenta model.

2. Materials and Methods

2.1. Cell and Viruses

Cells: Human embryonic lung fibroblast (HEF) (MRC-5 cells, bioMérieux, Craaponne, France) cells and epithelial cells (ARPE-19, ATCC[®] CRL-2302, Molsheim, France) were cultured in minimum essential medium (MEM, Eurobio scientific, Courtaboeuf, France) and minimal essential medium (DMEM F12, Fisher bioblock, Illkirch, France), respectively, and both were supplemented with 10% fetal bovine serum (FBS) (Eurobio scientific, Courtaboeuf, France), 50 µg/mL penicillin, and 10 µg/mL gentamycin. The cells were seeded into 48-well plates (10⁵ cells/well) and incubated for 5 days at 37 °C in 5% CO₂ until confluence was reached.

Viruses: The HCMV laboratory endotheliotropic strains TB40/E and VHL/E were kindly provided by Stephane Chavanas (UMR 1043, CPTP, Toulouse, France). Cell-free virus stocks of the TB40/E and VHL/E strains were obtained after consecutive passages on a confluent monolayer of ARPE-19 on 25, 75, and 175 cm² culture flasks with cytopathic effects up to 90–100%. After one more passage in a 175 cm² culture flask, supernatant was collected when the cytopathic effect reached 100%, clarified by centrifugation for 10 min at 3500 rpm, then stored at –80 °C. The infectious viral titer was determined by a plaque assay with 10-fold dilution steps on MRC-5 or ARPE19 cells and was expressed in foci-forming units per mL (pfu/mL).

2.2. Antiviral Compounds

CMV-HIG preparations are purified hyperimmunoglobulin products derived from pooled adult human plasma that are selected for high titers of antibodies against CMV. The

plasma is fractionated by ethanol precipitation of proteins to provide a product suitable for intravenous administration. Cytotect CP[®] is a sugar-free isotonic low-salt solution that contains 5% Ig (50 mg/mL) of which more than 96% is IgG (with approximately 65% IgG1, 30% IgG2, 3% IgG3, and 2% IgG4). The maximum level of immunoglobulin A (IgA) is 2 mg/mL. The anti-CMV content is 100 U/mL, where a unit is defined by the Paul Ehrlich Institute Standard [21]. The Cytotect CP[®] formulation replaced an earlier preparation in which viral inactivation treatment with β -propiolactone induced modifications of some amino acids, particularly the highly labile Fc fragment of IgG. Other modifications to the original plasma fractionation and purification processes were also implemented. These changes resulted in improved immunomodulatory properties of Cytotect CP[®], including greater inhibition of allogeneic T cell proliferation and cytokine production than the original Cytotect CP[®] product [22,23].

Cytotect CP[®] at 100 units/mL was provided by Biotest AG (Dreieich, Germany) and stored at 4 °C. For *in vitro* assays, Cytotect CP[®] was diluted in cell medium to obtain final concentrations of 0.005 U/mL, 0.015 U/mL, 0.05 U/mL, 0.15 U/mL, and 1.5 U/mL. For *ex vivo* assays, the final Cytotect CP[®] concentrations used were 0.015 U/mL, 0.15 U/mL, 1.5 U/mL, and 5 U/mL.

2.3. *In Vitro* Assays

2.3.1. Neutralization Assays

In vitro neutralization assays were performed with the VHL/E and TB40 strains as follows: One volume of cell-free virus stock was mixed with one volume of Cytotect CP[®] to reach a multiplicity of infection (MOI) of 0.1 and Cytotect CP[®] concentrations of 0.005 U/mL, 0.015 U/mL, 0.05 U/mL, 0.15 U/mL, and 1.5 U/mL in a 450 μ L final volume and incubated 1 h at 37 °C before supplementation with 50 μ L of FBS in every well. The dilutions were prepared in cell-corresponding medium without FBS. Cell-free virus and Cytotect CP[®] were then incubated on a cell monolayer of ARPE-19 or HEF in a 48-well plate for 3 h at 37 °C in 5% CO₂ before renewing the medium. After 5 days of incubation at 37 °C, cells were fixed with 90% acetone (20 min at −20 °C) and stained. Cells were incubated with mouse monoclonal antibodies against immediate early and early HCMV antigens (IEA/EA) (Argène, bioMérieux, Craponne, France) for 30 min at 37 °C at 1:50 in PBS without calcium and magnesium, washed twice for 10 min in PBS, incubated for 30 min at 37 °C with horseradish peroxidase anti-mouse secondary antibody (Dako, Santa Clara, CA, USA) at 1:100 in PBS, and washed twice again. After the addition of 3,3'-Diaminobenzidine (DAB, Dako, Santa Clara, CA, USA), foci of infection were counted with an inverted microscope to determine the 50% and 90% neutralizing doses (ND50 and ND90).

2.3.2. Cytotoxicity Assays

To determine the Cytotect CP[®] cytotoxic concentrations of 50% and 90% (CC50 and CC90), 50% or 90% cell death was evaluated in 96-well plates on HEF or ARPE-19 cells by measuring LDH release in the cell culture supernatant using a CytoTox 96[®] Non-Radioactive Cytotoxicity Assay kit (Promega, Charbonnières Les Bains, France) according to the manufacturer's instructions in a range from 0.005 U/mL to 0.015 U/mL, 0.05 U/mL, 0.15 U/mL, and 1.5 U/mL of Cytotect CP[®].

2.4. Placental Villi Explants

Placentae were collected from voluntary pregnancy terminations (8–14 weeks of gestation) from HCMV-seronegative women, after consent, in collaboration with the biological resources center of the Mother and Child Hospital of Limoges, France (Collection Biologique HME, CB-HME/CRBioLim, Limoges, France). The HCMV IgG status of the mother was determined by chemiluminescent enzymatic assay on a Liaison[®] XL analyzer (DiaSorin, Saluggia, Italy). Floating villi (5 mm³) biopsies were extracted from the placenta, washed with 0.9% saline solution, and cultured in HEF cell medium.

2.5. Ex Vivo Assays

The ex vivo model was adapted from Morère et al. [24] and was previously described in Jacquet et al. [25]. For all ex vivo assays, HEF cells were seeded into 48-well plates at 10^5 cells/well and then incubated for 5 days at 37 °C in 5% CO₂ until confluence was reached. HEF infection was performed with the endothelial strain TB40/E. We set up three different protocols to evaluate the efficacy of Cytotect CP® to reflect the reality of congenital infection: (1) neutralization assay before infection, (2) prevention of villi infection by the addition of Cytotect CP®, and (3) treatment of already infected villi. For all the experiments, Cytotect CP® was used at the following final concentrations: 0.015 U/mL, 0.15 U/mL, 1.5 U/mL, and 5 U/mL with a viral concentration at an MOI of 1.

(1) Neutralization assays. Cell-free virus stock was mixed with Cytotect CP® with the same protocol as the in vitro neutralization assays. The mix was then plated on cells for a 3-h incubation at 37 °C. After medium renewal, the plates were incubated at 37 °C in 5% CO₂. After five days, sponges (Spongostan dental™, NewPharma, Liège, Belgium) with placental villi explant were added to each well (Figure 1A) and were incubated with the different concentrations of Cytotect CP® at 37 °C in 5% CO₂.

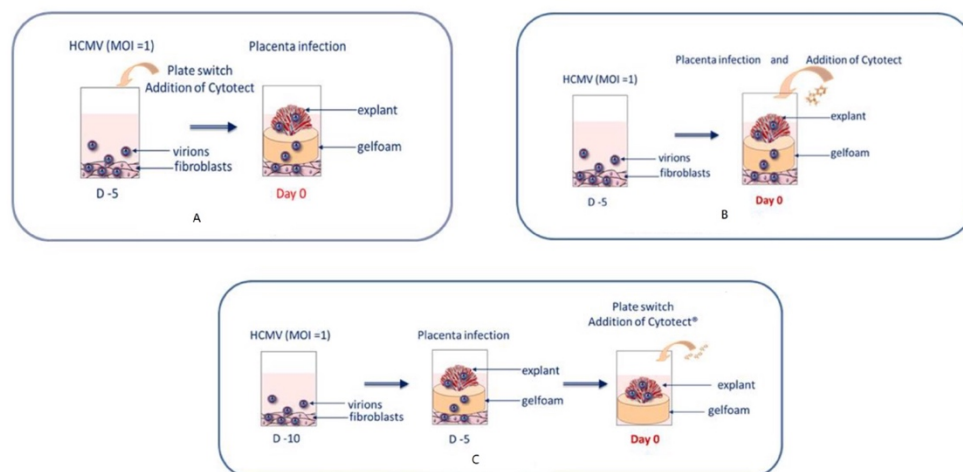


Figure 1. Ex vivo assays. Three different protocols were used to evaluate the efficacy of Cytotect CP®. For all ex vivo assays, HEF cells were seeded into 48-well plates at 10^5 cells/well and then incubated for 5 days at 37 °C in 5% CO₂ until confluence. The villi explant model is based on infection from cell-free virus produced by infected fibroblasts. HEF cells were infected with cell-free virus stock of the TB40/E strain with a multiplicity of infection (MOI) of 1 in HEF culture medium. The addition of explants on a gel foam (Spongostan dental™, NewPharma, Belgium) allowed infection by capillarity. We performed three types of assays, mimicking several real-life conditions in maternal blood, at the placental level, and after placental infection (A) **Neutralization assay:** The virus was neutralized by Cytotect CP® before the addition of placental explants. TB40/E and Cytotect CP® were incubated on an HEF plate for 3 h at 37 °C in 5% CO₂ before renewing the medium. After 5 days of incubation, a sponge with a placental villi explant was added in each well and was incubated at 37 °C in 5% CO₂. Day 0 was the first day of infection of the villi. (B) **Prevention of villi infection assay:** Cytotect CP® and explants were added simultaneously after 5 days of infection of the cells. Day 0 was the first day of infection of the villi. (C) **Efficacy assay:** Villi were added after 5 days of infection of the cells. After 5 days of infection of the villi, sponges and explants were transferred on new plates without cell monolayers and Cytotect CP® was added. Day 0 was 5 days after placental infection.

For the next two protocols, HEF cells were infected with cell-free virus stock of the TB40/E strain at an MOI of 1. The plates were centrifuged for 45 min at 3500 rpm at 37 °C before medium renewal and incubation for 5 days at 37 °C in 5% CO₂.

(2) To prevent villi infection from the HEF HCMV-infected cells, the different concentrations of Cytotect CP® in complete fresh medium were added simultaneously with sponges and villi explants on the infected HEF cells (Figure 1B). Complete fresh medium without the drug was set as a control. The plates were incubated at 37 °C in 5% CO₂ until the collection of the villi on days 7 and 14.

(3) For the treatment of already infected villi, sponges with villi explant were added to infected HEF cells and were incubated at 37 °C in 5% CO₂. After five days of infection, the sponges and explants were transferred on new plates without cell monolayers (Figure 1C). Complete fresh medium containing the different Cytotect CP® concentrations was added to each test condition.

For each ex vivo condition, villi explants were collected at different time points (days 7 and 14 post-infection or post-treatment for the efficacy assay, meaning day 14 and day 21 post-infection), washed in 0.9% saline solution, and stored at −80 °C. Supernatants were stored for beta-HCG quantification to evaluate placental viability. Assays were performed in triplicate for each condition and on three different placentae. Villi with complete fresh medium without the drug were set as a positive control of infection. Villi with complete fresh medium without the drug or viruses were set as a negative control.

2.5.1. Viral Load in Villi Explants

To quantify viral replication kinetics, total DNA was extracted from samples for each ex vivo condition and the viral load was measured by duplex quantitative PCR.

Total DNA extraction from villi explants: Explants were lysed with a 500 mL mix containing 10% proteinase K (Qiagen, Hilden, Germany), 6% Tris, 3% sodium dodecyl sulfate and 81% DNA/RNA-free water at 56 °C until total lysis (20 min). Then, total DNA extraction was performed using NucliSENS® technology on an EasyMag instrument (bioMérieux, Marcy-l'Étoile, France) following the protocol “specific B”.

A previously described duplex quantitative PCR for targeting HCMV *UL83* and cell albumin genes was performed to quantify the viral load in villi (CMV copies/10⁶ cells): Total DNA extract (5 µL of each) was mixed with 1× of Perfecta Multiplex qPCR toughmix (VWR International, Fontenay-sous-Bois, France, each primer (250 nM), each probe (200 nM), and DNA/RNA free water to reach a final volume of 25 µL. The qPCR cycling protocol was: 30 s at 95 °C, then 45 cycles of 45 s at 60 °C on the CFX96 Touch Real-Time PCR Detection System (Bio-Rad laboratories). The HCMV and albumin copies were quantified using a range of plasmids with the *UL83* or albumin gene using CFX Manager Software (Bio-Rad laboratories, Hercules, CA, USA). The primer sequences were: *UL83* (5'-GTCAGCGTTCGTGTTT CCCA-3' and 5'-GGGACACAACACCGTAAAGC-3') and albumin (5'-GCTGT CATCTCTGTGGGCTGT-3' and 5-AAACTCATGGGAGCTGCTGGT T-3'). The probes were: HCMV (Cyanine 5)- CCCGCAACCCGCAACCCCTTGATG- (BHQ3) 3' and albumin (6FAM)- CCTGTATGCCACACAAATCTCTCC- (TAMRA) (Eurogentec, Seraing, Belgium) [25].

2.5.2. β-hCG Dosage for Cytotoxicity in Villi Explants

Explant viability was assessed on days 7 and 14 in the previously mentioned tests. Supernatant was aliquoted and stored at −80 °C for β-hCG concentration measurement. β-hCG concentration was measured by an electroluminescent “sandwich” ELISA on magnetic microparticles (Cobas, Roche, France). The results were expressed in mUI per 10⁶ cells (using albumin coding sequence quantification as a reference). The concentration of hyperimmune globulins was considered toxic when β-hCG was significantly higher than the positive control villi without Cytotect CP®.

2.6. Statistical Analyses

Statistical analyses were performed in GraphPad Prism software (GraphPad Software, San Diego, CA, USA) by a dose-response analysis. In the ex vivo assays, the ND50 or EC50 were calculated with the “IC 50 calculator” software from AAT Bioquest and with GraphPad Prism software. Comparison analyses were performed using two-way ANOVA tests and Mann–Whitney tests for non-parametric data in GraphPad Prism software. Statistically significant differences were defined by a *p* value lower than 0.05.

3. Results

3.1. In Vitro Assays

The results of the neutralization assays on fibroblast and epithelial ARPE-19 cells performed against the VHL/E and TB40/E strains are presented in Figure 2. The ability of Cytotect CP® to neutralize infection by the HCMV strain showed similar profiles on both cell types. The ND50 and ND90 values were higher for the TB40/E strains (Table 1), although the difference with the VHL/E strain was not significant (*p* > 0.9). Cytotect CP® neutralizes HCMV infection of fibroblasts and epithelial cells in vitro.

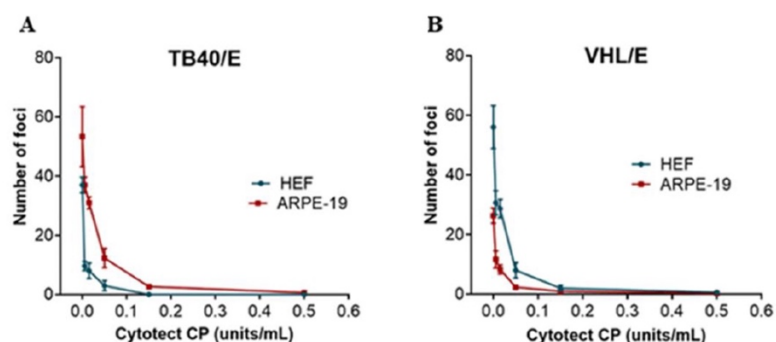


Figure 2. Neutralization activity of Cytotect CP® in vitro. The number of foci after the neutralization assay were counted for (A) the TB40/E strain and (B) the VHL/E strain on human embryonic fibroblast HEF cells and epithelial ARPE-19 cells after 5 days of incubation (*n* = 3 assays).

Table 1. In vitro neutralizing efficacy of Cytotect CP®. The efficacy of the compound was analyzed against the TB40/E and VHL/E strains on human embryonic fibroblast HEF cells and epithelial ARPE-19 cells. The 50 and 90% neutralizing dose (ND₅₀ and ND₉₀) values were determined using the results from Figure 2 with GraphPad Prism software.

Viral Strain	HEF		ARPE	
	ND ₅₀ ± SD (U/mL)	ND ₉₀ ± SD (U/mL)	ND ₅₀ ± SD (U/mL)	ND ₉₀ ± SD (U/mL)
VHL/E	0.014 ± 0.01	0.069 ± 0.02	0.011 ± 0.01	0.067 ± 0.02
TB40/E	0.033 ± 0.01	0.10 ± 0.01	0.032 ± 0.01	0.11 ± 0.02

ND: neutralizing dose; SD: standard deviation.

Cytotect CP® showed no cytotoxic effect on HEF and ARPE-19 cells, even for the highest concentration tested (20 U/mL). The CC50 and CC90 values were, therefore, not reached (data not shown).

3.2. Ex Vivo Assays

3.2.1. Replication of TB40/E in Villi Explants

Before efficacy analysis, the kinetics of TB40/E replication in the villi explants were checked from the positive control of infection (villi with viruses and no immunoglobulins) to assess the reliability of the ex vivo assays. The mean viral load in the villi was measured

on days 7, 14, and 21 post-infection in the positive controls from all assays (respectively, six, nine, and three placentae). The mean viral load was 28,136 copies/ 10^6 \pm 20,429 on day 7, 166,018 copies/ 10^6 \pm 240,632 on day 14, and 536,489 copies/ 10^6 cells \pm 621,515 on day 21. Although not significant, we observed a regular increase between days 7 and 21 ($p = 0.07$) (Figure 3).

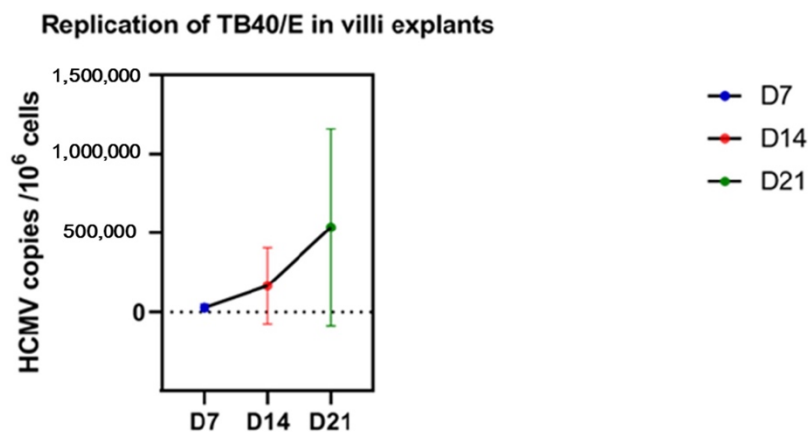


Figure 3. Kinetics of the endotheliotropic strain TB40/E in villi explants. The mean viral loads on days 7, 14, and 21 post-infection in the villi explants. The whiskers are extended to the extreme data points.

3.2.2. Impact of Cytotect CP[®] on Viral Replication

(1) Neutralization Assays

When infection was carried out after the neutralization of extracellular virus, the ND50, measured 7 and 14 days post-infection of the villi explants were, respectively, 0.011 UI/mL (95% CI: 0.005–0.025) and 0.093 UI/mL (95% CI: 0.019–0.841) ($p = 0.1712$), a concentration almost 10 times higher on day 14 (Figure 4). Cytotect CP[®] showed a neutralizing effect, with a significant decrease in the viral load from the positive control of 0.15 UI/mL on day 7 ($p = 0.029$) and 1.5 UI/mL on day 14 ($p = 0.037$).

On day 14, we observed a non-significant increase in the viral load at a Cytotect CP[®] concentration of 0.015 U/mL.

(2) Prevention of Villi Infection by the Addition of Cytotect CP[®] at the Time of Explant Infection

On day 7 post-infection, we observed a regular decrease in the viral load, with increasing concentrations but no significant decrease in the viral load in the explant, although the EC50 was reached at 0.024 U/mL (95% CI: 0.0007–0.3237). We did not observe any effect of the molecule on day 14, and we also observed on day 14 a non-significant increase in the viral load at a Cytotect CP[®] concentration of 0.015 UI/mL (Figure 5).

(3) Treatment of Infected Villi

When Cytotect CP[®] was added after infection of the villi, the only concentration that showed a decrease in the viral load was 1.5 UI/mL, but EC50 was not reached with increasing concentrations of Cytotect CP[®] in these efficacy assays. We also observed on day 14 a non-significant increase in the viral load at a Cytotect CP[®] concentration of 0.015 U/mL (Figure 6).

Impact of Cytotect on viral replication : Neutralization assays

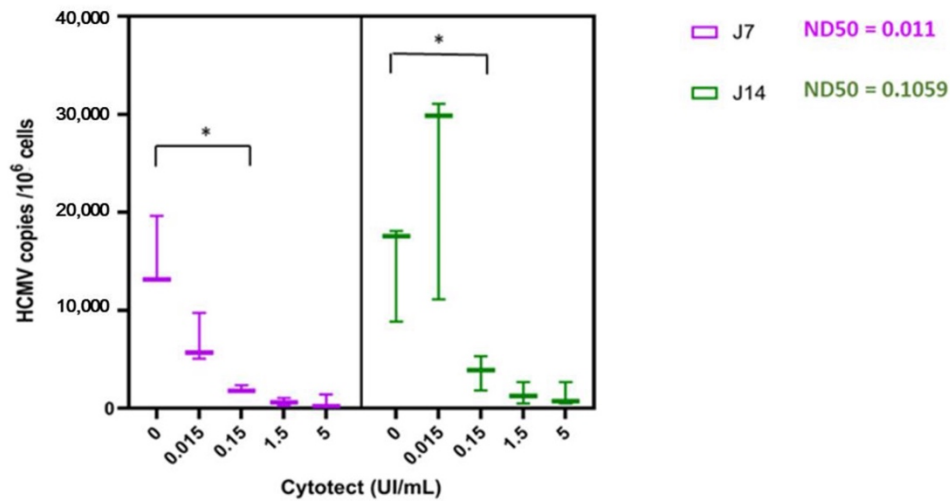


Figure 4. Neutralization assay: ex vivo viral load in villi at 7 and 14 days post-infection. The results were compiled from three placentae. The statistical analyses were carried out using GraphPad Prism with a two-way ANOVA (GraphPad Software, San Diego, CA, USA). * $p < 0.05$.

Impact of Cytotect on viral replication : Prevention villi infection assays

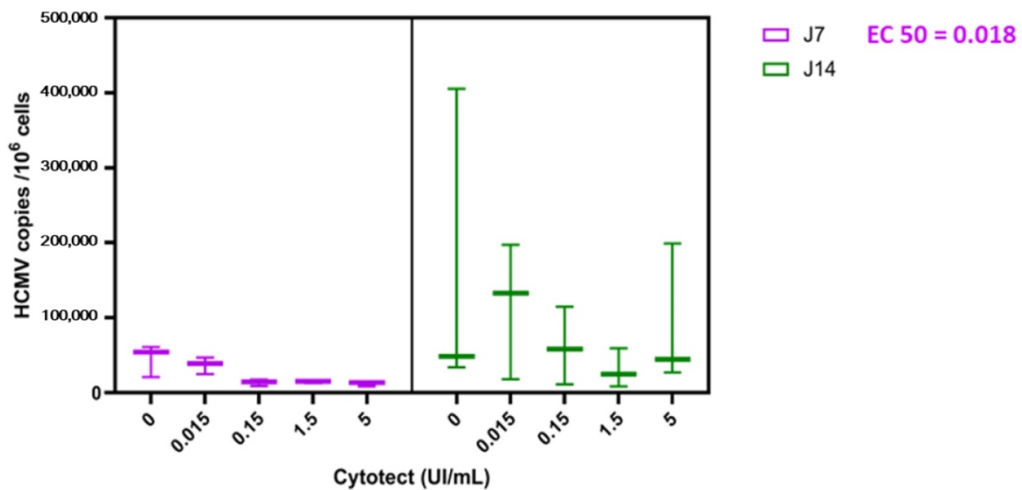


Figure 5. Prevention of villi infection assays. Virus and Cytotect CP[®] were added at the time of explant infection. The viral loads in the villi were measured at 7 and 14 days post-infection by comparison with the infected and non-treated villi (positive control “0”). The results were compiled from three placentae. The statistical analyses were carried out using GraphPad Prism with a two-way ANOVA (GraphPad Software, San Diego, CA, USA). The whiskers are extended to the extreme data points.

Impact of Cytotect on viral replication : Efficacy assays

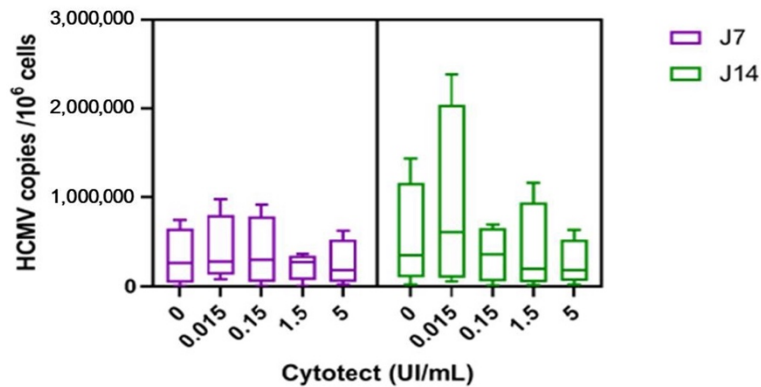


Figure 6. Efficacy assays. Viral loads were measured at 7 and 14 days post-treatment of infected villi and compared with infected and non-treated villi (positive control “0”). The results were compiled from three separate placentae. The boxplots are designed as medians (Q2), lower quartiles (Q1), and upper quartiles (Q3). The whiskers are extended to the extreme data points.

3.2.3. Placenta Viability

As in the *in vitro* assays, Cytotect CP[®] did not show toxicity on placental villi (Figure 7).

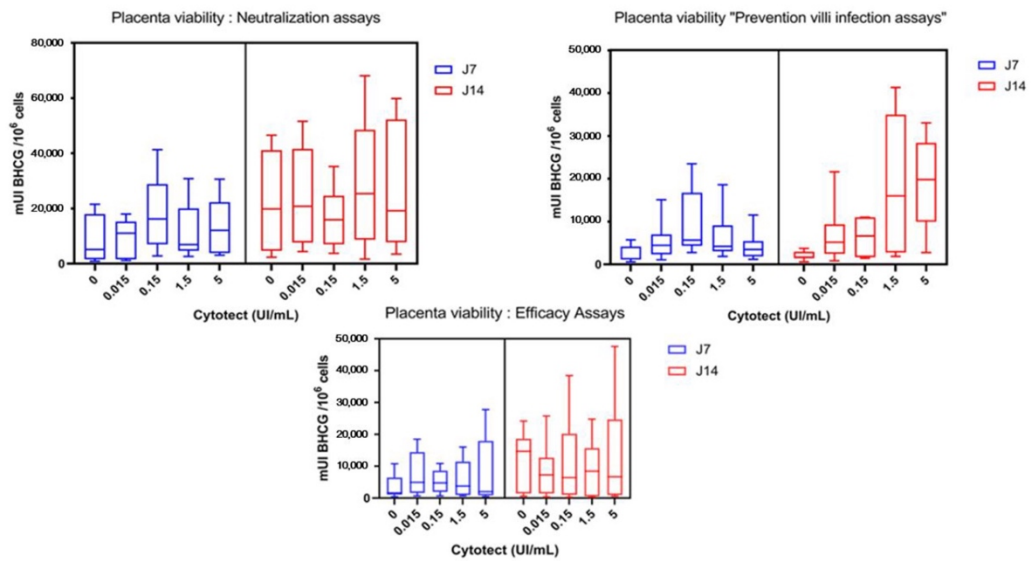


Figure 7. Placenta viability at 7 and 14 days post-infection for the “neutralization” and “prevention” assays and at 14 and 21 days post-infection for the “efficacy” assay. β-hCG units are indicated per 10⁶ cells for each concentration. In this figure, “0” corresponds to the infected villi without Cytotect CP[®] (positive control). The boxplots are designed as medians (Q2), lower quartiles (Q1), and upper quartiles (Q3) from three placentae. The whiskers are extended to the extreme data points. No significant difference was found between concentrations.

On day 7, the mean β-hCG level in the negative control villi was $13,482 \pm 22,986$ mUI β-hCG/10⁶ cells compared to $14,055 \pm 15,978$ in the positive control villi without Cytotect CP[®]

($p = 0.46$). On day 14, the β -hCG level in the negative control villi was $15,904 \pm 31,553$ mUI β -hCG/ 10^6 cells compared to $12,859 \pm 13,995$ in the positive control villi without Cytotect CP[®] ($p = 0.48$). On day 21, the β -hCG level in the negative control villi was 5096 ± 5930 mUI β -hCG/ 10^6 cells compared to $10,124 \pm 10,076$ in the positive control villi without Cytotect CP[®] ($p = 0.69$). There was no significant difference in the β -hCG levels of the native villi (negative control) and the villi infected without immunoglobulin (positive control) (Figure 8A).

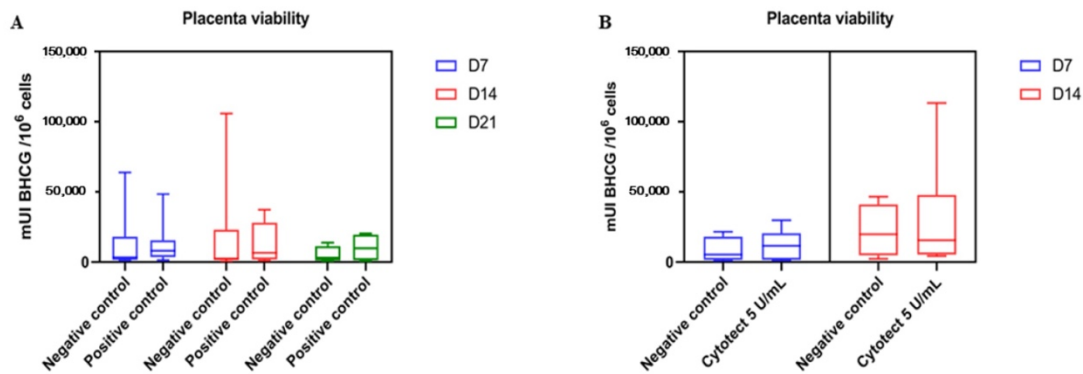


Figure 8. Placenta viability. (A) Comparison of β -hCG levels between the negative control villi and villi infected with TB40E without Cytotect CP[®] after 7, 14, and 21 days of infection. (B) Comparison of β -hCG levels from the negative control villi and villi with only Cytotect CP[®] after 7 and 14 days of exposure to the maximum tested dose. The boxplots are designed as medians (Q2), lower quartiles (Q1), and upper quartiles (Q3). The whiskers are extended to the extreme data points.

We also compared the median β -hCG level in negative control villi and villi with Cytotect CP[®] at the maximum dose of 5 U/mL used in our ex vivo assays without TB40/E (Figure 8B). We did not find any significant difference on either day 7 ($p = 0.8148$) or day 14 ($p > 0.9999$) of exposure to Cytotect CP[®].

4. Discussion

Amongst the molecules effective against CMV, none is approved, to date, for the prevention of maternofetal CMV transmission. While administered to congenitally infected newborns, Valganciclovir[®] or Ganciclovir[®] are not currently approved for use in pregnant women due to their hematotoxicity. Other antivirals used in the management of immunocompromised patients (Foscarnet[®] and Cidofovir[®]) cannot be used in this context due to their renal toxicity. In 2020, Shahar-Nissan et al. published the only randomized trial to date demonstrating that Valaciclovir[®], an Acyclovir[®] prodrug, given at a high dose (8 g/d) would reduce the risk of fetal transmission from 30 to 11% for women with a primary infection during the first trimester of pregnancy or periconceptional period ($p = 0.027$; odds ratio 0.29, 95% CI 0.09–0.90) [26]. No side effects have been reported to date in women or fetuses treated with high doses of Valaciclovir[®] [26].

In parallel, there is a growing interest in the use of antibodies mimicking or enhancing natural defenses at the placental level, but the results from clinical studies are rather disparate. Despite encouraging results in non-randomized studies [11,14,15,27], the efficacy of HIG has not been confirmed in the only two randomized studies published to date. Revello et al. in 2014 showed a rate of maternal-fetal transmission of 30% in the group of patients treated with HIG vs. 44% in the control group ($p = 0.13$) and observed a non-significant increase in the risk of obstetrical events (13% vs. 2%), such as prematurity (7.6%), preeclampsia (1.9%), and intrauterine growth retardation (3.8%), in the treated group [13]. This trial was probably impaired by the use of insufficient doses of immunoglobulins (100 U/kg) that were not frequent enough (monthly administration) with respect to the

11-day half-life of immunoglobulins and delayed (median administration was 5 weeks after the diagnosis of infection) and by the inclusion of patients with a primary infection in the second trimester [15]. In 2020, another randomized clinical trial began in the United States with the same criteria. Initially designed on the basis of 800 patients to be included, the trial was stopped at an interim analysis at 399 patients because of a lack of treatment efficacy: 22.7% transmission in the immunoglobulin group and 19.4% in the placebo group. Prematurity rates were similar in the two groups (12.2% vs. 8.3%) [9]. Gabrielli et al. histologically analyzed HIG effects on placentas collected for the Revello study and showed no significant differences for all tissue damage between the HIG and placebo groups [28]. Based on the recent pharmacokinetics study indicating that the half-life of HIG is only about 10 days [10,29], a new observational study was undertaken in 149 pregnant women to study the efficacy of Cytotect CP[®] in pregnant women with a very recent primary infection in the first trimester or during the periconceptional period. Cytotect CP[®] was administered every 15 days until 18 weeks of amenorrhea, on average only four times, at a dose of 200 IU/kg bodyweight in patients with a primary infection before 14 weeks of amenorrhea. Intravenous treatment was initiated within 3 weeks [19]. In this study, the rate of maternal-fetal transmission was significantly lower than in their 2018 cohort (7.5% in the intervention group vs. 35.2% in the control group; $p < 0.0001$) [10]. In 2020, Seidel et al. also published an observational study using the same doses as Kagan et al. and found a significant decrease in the rate of maternal-fetal transmission of 23.9%, regardless of the term of the pregnancy [15], compared to 39.9% in the control group of the historical cohort of Feldman et al. ($p = 0.026$) [30]. These two recent studies did not find an excess risk of obstetrical events. Kagan et al. suggest a possible link with the discontinuation of immunoglobulins in their study at 20 weeks' gestation. As a curative treatment, Cytotect CP[®] has also shown encouraging results for continued use [31]. Last year, Tanimura et al. compared the outcome of symptomatic fetuses receiving immunoglobulin fetal therapy (Ig FT) with or without neonatal treatment (NT) with Valganciclovir[®] or Ganciclovir[®] versus symptomatic fetuses receiving only neonatal treatment. The proportion of infants with severe disorders in the fetal therapy group was significantly lower than that in the neonatal therapy group (18.2% vs. 64.3%, $p < 0.05$). This is the first study demonstrating that Ig FT in addition to NT may be more effective in improving the neurological outcomes of newborns with symptomatic cCMV as compared to neonatal treatment only [32]. As a whole, these recent results suggest the capacity of HIG to prevent or eventually treat cCMV.

Due to the heterogeneity of these clinical results using different doses and timing protocols and the obstetrical side effects observed in some studies [13,33], we aimed to specifically assess the efficacy and toxicity of Cytotect CP[®]. Therefore, we herein revisited the effect of Cytotect CP[®] in our first-trimester HCMV infection model that was previously validated for antiviral efficacy testing [24,25]. We adapted it to reflect the three stages of potential inhibition by HIG. The efficacy and toxicity can be measured, and these *ex vivo* results can be correlated with previous clinical results. Our model preserves cellular and tissue integrity, unlike *in vitro* models, which use chemical cleavage methods to isolate placental cells, promoting viral permissiveness [34,35], and our three assay times (especially B and C) reflect the reality of congenital infection. Placental villi from the first trimester were used to reflect first-trimester transmission, which is involved in the most severe sequelae [6,7,36]. This model showed robust and reproducible results for the evaluation of direct and indirect anti-CMV drugs inhibiting cellular components with both reference strains and clinical isolates [25]. For this first evaluation, we used cell-free stocks from one reference strain that was proven to infect placental explants: TB40/E. As described previously by Jacquet et al., the endotheliotropic strain TB40/E replicated with a significantly increased rate between day 4 and day 13 and in the first trimester compared to the third trimester [25]. We also found an increase with a significant disparity between placentas. This is one of the limitations of our study, which can be related to the term of the pregnancy, the delay before the use of the placenta, or the individual susceptibility in connection with the innate immunity of each. This justified repeated

experiments with different placentae. To our knowledge, it is the first time that such specific assays including both efficacy and toxicity evaluations on placentae with Cytotect CP[®] are shown. As there are multiple effects of immunoglobulins on placenta infection, each antibody or HIG preparation may result in different immune stimulations. It is, thus, important to specifically test the efficacy and toxicity of the preparation we intend to use in a clinical trial. Neutralizing antibodies have a varying capacity to interfere in vitro with the HCMV entry routes mediating infection of fibroblasts and epithelial cells. However, both may be required to enter and spread in the placenta to the fetus. The infection of fibroblasts and epithelial cells by HCMV requires glycoprotein complexes composed of gB and gH/gL/gO [37]. Neutralizing antibodies directed against gB or gH epitopes interfere with both fibroblast and epithelial cell infections. Epithelial cell infection is additionally dependent on the envelope pentamer complex composed of gH, gL, UL128, UL130, and UL131A. However, neutralizing antibodies primarily targeting the conformational epitopes of the UL128/130/131A subunits cannot prevent fibroblast entry but are effective in blocking epithelial cell infection [38]. Thus, testing the potential of HIG first in various cell types and in more complex systems in ex vivo placental tissues that mimic the maternofetal interface and placental tissues is more relevant.

We initially confirmed in vitro the neutralizing capacity of Cytotect CP[®] in both the fibroblasts and epithelial ARPE-19 cell lines on the endothelial strains selected for the assays and its absence of cytotoxicity, even at the highest doses. The DN50 and DN90 values were similar in both cell types. They were below the calculated plasma concentrations of 0.15 U/mL after a 400 U/kg administration for preemptive treatment, but the DN90 were close to or over the expected concentration of 0.03 U/mL under the prophylaxis dosage (100 U/Kg). Thus, the first important result was the absence of cytotoxicity of Cytotect CP[®], both in vitro and ex vivo, with no alteration of explant viability within a prolonged period of observation of 14 days. This is in agreement with previous results from Kagan's clinical observations [10,19].

Second, Cytotect CP[®] demonstrated a strong neutralizing capacity against HCMV infection ex vivo, as the contact of the immunoglobulins with the virus clearly limited the placental infection. With the second protocol that more closely reflected the reality of congenital infection, where viruses and antibodies meet at the placental interface, Cytotect CP[®] seemed to be effective on D7 but not on D14. The 11-day half-life of immunoglobulins could explain the loss of Cytotect CP[®] effectiveness on D14. Conversely, Cytotect CP[®] did not show any efficacy on already infected villi and, therefore, for the curative treatment of congenital infection. In all our placentae on D14, we also observed a non-significant increase in the viral load at the 0.015 U/mL concentration of Cytotect CP[®]. One hypothesis is that a low dose of immunoglobulin may not be sufficient to stimulate immunity and may allow viral replication. The increase of ND50 between D7 and D14 in the neutralization assays and the absence of action of the molecule on D14 in our prevention trials could suggest the need to renew the immunoglobulins every 7 days to maintain their effect as in certain pregnancy therapies (platelet alloimmunization, for example, [39]) where their administration schedule is weekly. The hypothesis is in agreement with previous HIG pharmacokinetics studies [10,29]. Further determination of residual neutralizing titers in the assay supernatants over time could also be implemented to check this hypothesis and then new prevention and efficacy ex vivo assays with the renewal of the immunoglobulins on D7. Another hypothesis to explain our results would be that the viral propagation from cell to cell in the explant is slower than cell-free spread. This could explain the inefficiency of Cytotect CP[®] when added after the infection of the explant in assay C. In the villi infection prevention assay, antibodies could prevent cell-free spread but not cell-to-cell spread, which would explain an effect of Cytotect CP[®] on day 7 but not on day 14 due to an excessive viral load in the villi.

Indeed, the mechanism by which natural immunoglobulins act at the placental level is not yet elucidated. Anti-HCMV antibodies could promote NK cell activity during viral infection [40]. In addition, IgG has a protective role towards HCMV infection at

the maternal–fetal interface [41]. These IgG can bind to FcRn receptors expressed on the surface of syncytiotrophoblasts. However, their role is also double-edged. Indeed, viral particles bound to these IgG could use the ability of IgG to cross syncytiotrophoblasts to infect the fetus [42]. Moreover, these mechanisms can differ between human monoclonal antibodies (mAbs) or different HIG preparations. Tabata et al., in their study, measured the efficacy of a select subset of human mAbs to HCMV attachment/entry factors, including glycoprotein B (gB) and the pentameric complex gH/gL-pUL128–131, in preventing the infection and spread of a clinical strain in primary placental cells and explants of developing anchoring villi [20]. They studied only the infection neutralization (similar to our assay A) and the efficacy on day 1 post-infection (our assay C) with mAbs against HCMV gB (mAb 3–25, targeting site AD-2), gH/gL (mAb 3–16, gH-specific, targeting pentamer site 7), and the pUL128–131 portion of the pentameric complex (mAbs 1–103, targeting pentamer site 3 and mAbs 2–18, targeting pentamer site 1). They also used Cytogam[®] (HIG) and Synagis[®], a human mAb to respiratory syncytial virus, in their model of placental infection [20,43,44]. They concluded that neutralizing mAbs directed to pUL128–131 of the pentamer complex gB and gH/gL perform significantly better than Cytogam[®] in the neutralization of HCMV infection in primary placental cells and reduce infection in anchoring villus explants of first-trimester placentas. Thus, they suggested that treatment with combinations of mAbs, especially those to pUL128–131 of the pentameric complex, could be significantly more effective than current treatments with HIG to reduce HCMV transmission and congenital infection. Cytogam[®] is a CMV hyperimmune globulin that is derived from human plasma with high anti-CMV antibody titers, which contains a standardized amount of Ig ($5 \pm 0.1\%$) with sucrose, human albumin, and sodium as an excipient. In the USA, Cytogam[®] (CMVIG CG; CSL Behring, Bern, Switzerland) is licensed for the prophylaxis of CMV disease associated with heart, lung, liver, kidney, and pancreas transplantation, whereas in Europe, Cytotect CP[®] is licensed for the prophylaxis of CMV infection in patients receiving immunosuppressive therapy, particularly after solid organ or other transplants [45]. Germer and Miescher compared in their respective studies Cytotect CP[®] and Cytogam[®] with standard immunoglobulins [22,45]. Germer et al. showed consistently high and comparable CMV-binding avidity and recognition of CMV-specific antigens coupled with a similar neutralizing activity against CMV for both HIG in their neutralization assays on fibroblasts [22]. Miescher et al. observed that Cytotect CP[®] (50 mg/mL IgG and 100 PEIU/mL) contained a somewhat higher ELISA titer of anti-CMV antibodies, but Cytogam[®] (50 mg/mL Ig) demonstrated a better CMV-neutralizing activity on fibroblasts [45]. Both authors agree that compared to the standard IVIG, CMV-HIG preparations showed a higher CMV-binding activity and wider recognition of the tested CMV-specific glycoprotein antigens as well as improved neutralizing capacity. Although, based on their components and their properties, Cytogam[®] and Cytotect CP[®] preparations are not fully identical.

Our results were obtained from a laboratory virus strain and need to be supplemented by testing a congenital virus strain to approximate the mechanism of congenital CMV infection. Moreover, cell-free virus is classically less likely to spread cell-to-cell than a clinical isolate. Thus, with a congenital virus strain, antibodies might be more effective in neutralizing more virus released from infected cells. It is the first time that the potential of the HIG Cytotect CP[®] (Biotest, Germany) is specifically studied as a candidate for congenital infection prevention or treatment in this first-trimester placenta villi model, and it seems to us that this study brings interesting therapeutic perspectives. As a whole, our results support the need for a weekly effective back-to-back treatment initiated early before placental infection. This therapeutic strategy could be made possible by the implementation of a systematic screening for CMV, which has already been introduced in some centers [46,47].

5. Conclusions

Therapies for HCMV represent a major unmet need. The suggested efficiency of Cytotect CP[®] in prophylaxis is sustained by our results *in vitro* and in placental villi,

showing good efficacy and a low toxicity in different paths of infection. Additional studies will be conducted to evaluate this molecule as a curative treatment.

Author Contributions: P.C.M.: substantial contributions to the conception or design of the work, drafting the work and revising it critically for important intellectual content, substantial contributions to the acquisition, analysis, and interpretation of data for the work, project development, data collection, and manuscript writing; C.J.: substantial contributions to the conception or design of the work, drafting the work and revising it critically for important intellectual content, substantial contributions to the acquisition, analysis, and interpretation of data for the work, data collection, and manuscript reviewing; C.M.: data analysis and revising the work critically for important intellectual content; M.C.: data (placenta) collection and revising the work critically for important intellectual content; C.E.H.: data (placenta) collection and revising the work critically for important intellectual content; T.C.: data acquisition and analysis (β -hCG) and revising the work critically for important intellectual content; S.H.: data analysis and revising the work critically for important intellectual content; S.A.: project development supervisor, substantial contributions to the conception or design of the work, drafting the work and revising it critically for important intellectual content, and manuscript reviewing. All authors have read and agreed to the published version of the manuscript.

Funding: FONDS IBEN (study grant for P. Coste Mazeau, PhD).

Institutional Review Board Statement: Not applicable.

Informed Consent Statement: Informed consent was obtained from all subjects (placentae) involved in the study.

Data Availability Statement: The data presented in this study are available on request from the corresponding author.

Acknowledgments: We are thanking the members of the Collection Biologique HME and all the midwives who participated in this project. We thank Thierry Chianea and the technicians of the Biochemistry platform for the β -hCG measurements. We also want to thank Stephane Chavanas (UMR 1043, CPTP, Toulouse, France) for giving both the TB40/E and VHL/E strains. We also gratefully acknowledge Biotest for providing Cytotect CP[®] and IBEN (Institut Ben-Ari Neuroarchéologie) for supporting this research project.

Conflicts of Interest: The authors declare no conflict of interest.

References

1. Kumazaki, K.; Ozono, K.; Yahara, T.; Wada, Y.; Suehara, N.; Takeuchi, M.; Nakayama, M. Detection of cytomegalovirus DNA in human placenta. *J. Med. Virol.* **2002**, *68*, 363–369. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
2. Tabata, T.; Pettitt, M.; Fang-Hoover, J.; Zydek, M.; Pereira, L. Persistent Cytomegalovirus Infection in Amniotic Membranes of the Human Placenta. *Am. J. Pathol.* **2016**, *186*, 2970–2986. [[CrossRef](#)]
3. Sinzger, C.; Müntefering, H.; Loning, T.; Stöss, H.; Plachter, B.; Jahn, G. Cell types infected in human cytomegalovirus placentitis identified by immunohistochemical double staining. *Virchows Arch.* **1993**, *423*, 249–256. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
4. Hamilton, S.T.; Scott, G.; Naing, Z.; Iwasenko, J.; Hall, B.; Graf, N.; Arbuckle, S.; Craig, M.E.; Rawlinson, W.D. Human Cytomegalovirus-Induces Cytokine Changes in the Placenta with Implications for Adverse Pregnancy Outcomes. *PLoS ONE* **2012**, *7*, e52899. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
5. Becroft, D.M. Prenatal cytomegalovirus infection: Epidemiology, pathology and pathogenesis. *Perspect. Pediatr. Pathol.* **1981**, *6*, 41.
6. Chatzakis, C.; Ville, Y.; Makrydimas, G.; Dinas, K.; Zavlanos, A.; Sotiriadis, A. Timing of primary maternal cytomegalovirus infection and rates of vertical transmission and fetal consequences. *Am. J. Obstet. Gynecol.* **2020**, *223*, 870–883.e11. [[CrossRef](#)]
7. Leruez-Ville, M.; Foulon, I.; Pass, R.; Ville, Y. Cytomegalovirus infection during pregnancy: State of the science. *Am. J. Obstet. Gynecol.* **2020**, *223*, 330–349. [[CrossRef](#)]
8. Hyde, T.B.; Schmid, D.S.; Cannon, M.J. Cytomegalovirus seroconversion rates and risk factors: Implications for congenital CMV. *Rev. Med. Virol.* **2010**, *20*, 311–326. [[CrossRef](#)]
9. Hughes, B.L.; Clifton, R.G.; Rouse, D.J.; Saade, G.R.; Dinsmoor, M.J.; Reddy, U.M.; Pass, R.; Allard, D.; Mallett, G.; Fette, L.M.; et al. A Trial of Hyperimmune Globulin to Prevent Congenital Cytomegalovirus Infection. *N. Engl. J. Med.* **2021**, *385*, 436–444. [[CrossRef](#)]
10. Kagan, K.O.; Enders, M.; Schampera, M.S.; Baeumel, E.; Hoopmann, M.; Geipel, A.; Berg, C.; Goelz, R.; De Catte, L.; Wallwiener, D.; et al. Prevention of maternal–fetal transmission of cytomegalovirus after primary maternal infection in the first trimester by biweekly hyperimmunoglobulin administration. *Ultrasound Obstet. Gynecol.* **2019**, *53*, 383–389. [[CrossRef](#)]

11. Nigro, G.; Adler, S.P.; La Torre, R.; Best, A.M.; Congenital Cytomegalovirus Collaborating Group. Passive Immunization during Pregnancy for Congenital Cytomegalovirus Infection. *N. Engl. J. Med.* **2005**, *353*, 1350–1362. [CrossRef] [PubMed]
12. Bartlett, A.W.; Hamilton, S.T.; Shand, A.W.; Rawlinson, W.D. Fetal therapies for cytomegalovirus: What we tell prospective parents. *Prenat. Diagn.* **2020**, *40*, 1681–1692. [CrossRef] [PubMed]
13. Revello, M.G.; Lazzarotto, T.; Guerra, B.; Spinillo, A.; Ferrazzi, E.; Kustermann, A.; Guaschino, S.; Vergani, P.; Todros, T.; Frusca, T.; et al. A randomized trial of hyperimmune globulin to prevent congenital cytomegalovirus. *N. Engl. J. Med.* **2014**, *370*, 1316–1326. [CrossRef] [PubMed]
14. Nigro, G. Hyperimmune globulin in pregnancy for the prevention of congenital cytomegalovirus disease. *Expert Rev. Anti-Infect. Ther.* **2017**, *15*, 977–986. [CrossRef]
15. Seidel, V.; Hackelöer, M.; Rancourt, R.C.; Henrich, W.; Siedentopf, J.-P. Fetal and maternal outcome after hyperimmunoglobulin administration for prevention of maternal–fetal transmission of cytomegalovirus during pregnancy: Retrospective cohort analysis. *Arch. Gynecol. Obstet.* **2020**, *302*, 1353–1359. [CrossRef]
16. Devlieger, R.; Buxmann, H.; Nigro, G.; Enders, M.; Jückstock, J.; Siklós, P.; Wartenberg-Demand, A.; Schüttrumpf, J.; Schütze, J.; Rippel, N.; et al. Serial Monitoring and Hyperimmunoglobulin versus Standard of Care to Prevent Congenital Cytomegalovirus Infection: A Phase III Randomized Trial. *Fetal Diagn. Ther.* **2021**, *48*, 611–623. [CrossRef]
17. Carbone, J. The Immunology of Posttransplant CMV Infection: Potential Effect of CMV Immunoglobulins on Distinct Components of the Immune Response to CMV. *Transplantation* **2016**, *100*, S11–S18. [CrossRef]
18. Bonaros, N.; Mayer, B.; Schachner, T.; Laufer, G.; Kocher, A. CMV-hyperimmune globulin for preventing cytomegalovirus infection and disease in solid organ transplant recipients: A meta-analysis. *Clin. Transpl.* **2008**, *22*, 89–97. [CrossRef]
19. Kagan, K.O.; Enders, M.; Hoopmann, M.; Geipel, A.; Simonini, C.; Berg, C.; Gottschalk, I.; Faschingbauer, F.; Schneider, M.O.; Ganzenmueller, T.; et al. Outcome of pregnancies with recent primary cytomegalovirus infection in first trimester treated with hyperimmunoglobulin: Observational study. *Ultrasound Obstet. Gynecol.* **2021**, *57*, 560–567. [CrossRef]
20. Tabata, T.; Pettitt, M.; Fang-Hoover, J.; Freed, D.C.; Li, F.; An, Z.; Wang, D.; Fu, T.M.; Pereira, L. Neutralizing Monoclonal Antibodies Reduce Human Cytomegalovirus Infection and Spread in Developing Placentas. *Vaccines* **2019**, *7*, 135. [CrossRef]
21. Paul-Ehrlich-Institut—Préparations d’Immunoglobulines. Available online: <https://www.pei.de/DE/arzneimittel/antikoerper/immunglobulinpraeparate/immunglobulinpraeparate-node.html?sessionid=29DBBB9C2CE956CF6F9031BC2C19E0B3.intranet231> (accessed on 25 February 2022).
22. Germer, M.; Herbener, P.; Schüttrumpf, J. Functional Properties of Human Cytomegalovirus Hyperimmunoglobulin and Standard Immunoglobulin Preparations. *Ann. Transpl.* **2016**, *21*, 558–564. [CrossRef] [PubMed]
23. van Gent, R.; Jaadar, H.; Tjon, A.S.W.; Mancham, S.; Kwekkeboom, J. T-cell inhibitory capacity of hyperimmunoglobulins is influenced by the production process. *Int. Immunopharmacol.* **2014**, *19*, 142–144. [CrossRef] [PubMed]
24. Morere, L.; Andouard, D.; Labrousse, F.; Saade, F.; Calliste, C.A.; Cotin, S.; Aubard, Y.; Rawlinson, W.D.; Esclaire, F.; Hantz, S.; et al. Ex vivo model of congenital cytomegalovirus infection and new combination therapies. *Placenta* **2015**, *36*, 41–47. [CrossRef] [PubMed]
25. Jacquet, C.; Marschall, M.; Andouard, D.; El Hamel, C.; Chianea, T.; Tsogoeva, S.B.; Hantz, S.; Alain, S. A highly potent trimeric derivative of artesunate shows promising treatment profiles in experimental models for congenital HCMV infection in vitro and ex vivo. *Antiviral Res.* **2020**, *175*, 104700. [CrossRef] [PubMed]
26. Shahar-Nissan, K.; Pardo, J.; Peled, O.; Krause, I.; Bilavsky, E.; Wiznitzer, A.; Hadar, E.; Amir, J. Valaciclovir to prevent vertical transmission of cytomegalovirus after maternal primary infection during pregnancy: A randomised, double-blind, placebo-controlled trial. *Lancet* **2020**, *396*, 779–785. [CrossRef]
27. Buxmann, H.; Stackelberg, O.M.; Schlößer, R.L.; Enders, G.; Gonser, M.; Meyer-Wittkopf, M.; Hamprecht, K.; Enders, M. Use of cytomegalovirus hyperimmunoglobulin for prevention of congenital cytomegalovirus disease: A retrospective analysis. *J. Perinat. Med.* **2012**, *40*, 439–446. [CrossRef]
28. Gabrielli, L.; Bonasoni, M.P.; Foschini, M.P.; Silini, E.M.; Spinillo, A.; Revello, M.G.; Chierighin, A.; Piccirilli, G.; Petrisli, E.; Turello, G.; et al. Histological Analysis of Term Placentas from Hyperimmune Globulin-Treated and Untreated Mothers with Primary Cytomegalovirus Infection. *Fetal Diagn. Ther.* **2018**, *45*, 111–117. [CrossRef]
29. Hamprecht, K.; Kagan, K.O.; Goelz, R. Hyperimmune Globulin to Prevent Congenital CMV Infection. *N. Engl. J. Med.* **2014**, *370*, 2543–2545. [CrossRef]
30. Feldman, B.; Yinon, Y.; Tepperberg Oikawa, M.; Yoeli, R.; Schiff, E.; Lipitz, S. Pregestational, periconceptual, and gestational primary maternal cytomegalovirus infection: Prenatal diagnosis in 508 pregnancies. *Am. J. Obstet. Gynecol.* **2011**, *205*, 342.e1–342.e6. [CrossRef]
31. Visentin, S.; Manara, R.; Milanese, L.; Da Roit, A.; Forner, G.; Salviato, E.; Citton, V.; Magno, F.M.; Orzan, E.; Morando, C.; et al. Early primary cytomegalovirus infection in pregnancy: Maternal hyperimmunoglobulin therapy improves outcomes among infants at 1 year of age. *Clin. Infect. Dis.* **2012**, *55*, 497–503. [CrossRef]
32. Tanimura, K.; Shi, Y.; Uchida, A.; Uenaka, M.; Imafuku, H.; Ikuta, T.; Fujioka, K.; Morioka, I.; Deguchi, M.; Minematsu, T.; et al. Immunoglobulin fetal therapy and neonatal therapy with antiviral drugs improve neurological outcome of infants with symptomatic congenital cytomegalovirus infection. *J. Reprod. Immunol.* **2020**, *143*, 103263. [CrossRef] [PubMed]

33. Chiaie, L.D.; Neuberger, P.; Vochem, M.; Lihs, A.; Karck, U.; Enders, M. No evidence of obstetrical adverse events after hyperimmune globulin application for primary cytomegalovirus infection in pregnancy: Experience from a single centre. *Arch. Gynecol. Obstet.* **2018**, *297*, 1389–1395. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
34. Hemmings, D.G.; Kilani, R.; Nykiforuk, C.; Preiksaitis, J.; Guilbert, L.J. Permissive Cytomegalovirus Infection of Primary Villous Term and First Trimester Trophoblasts. *J. Virol.* **1998**, *72*, 4970–4979. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
35. Halwachs-Baumann, G.; Wilders-Truschnig, M.; Desoye, G.; Hahn, T.; Kiesel, L.; Klingel, K.; Rieger, P.; Jahn, G.; Sinzger, C. Human trophoblast cells are permissive to the complete replicative cycle of human cytomegalovirus. *J. Virol.* **1998**, *72*, 7598–7602. [[CrossRef](#)]
36. Bardon, V.F.; Magny, J.-F.; Parodi, M.; Couderc, S.; Garcia, P.; Maillotte, A.-M.; Benard, M.; Pinquier, D.; Astruc, D.; Patural, H.; et al. Sequelae of Congenital Cytomegalovirus Following Maternal Primary Infections Are Limited to Those Acquired in the First Trimester of Pregnancy. *Clin. Infect. Dis.* **2019**, *69*, 1526–1532. [[CrossRef](#)]
37. Kalsner, J.; Adler, B.; Mach, M.; Kropff, B.; Puchhammer-Stöckl, E.; Görzer, I. Differences in Growth Properties among Two Human Cytomegalovirus Glycoprotein O Genotypes. *Front. Microbiol.* **2017**, *8*, 1609. [[CrossRef](#)]
38. Wussow, F.; Chiuppesi, F.; Contreras, H.; Diamond, D.J. Neutralization of Human Cytomegalovirus Entry into Fibroblasts and Epithelial Cells. *Vaccines* **2017**, *5*, 39. [[CrossRef](#)]
39. Bussel, J.B.; Haar, E.L.V.; Berkowitz, R.L. New developments in fetal and neonatal alloimmune thrombocytopenia. *Am. J. Obstet. Gynecol.* **2021**, *225*, 120–127. [[CrossRef](#)]
40. Costa-Garcia, M.; Vera, A.; Moraru, M.; Vilches, C.; López-Botet, M.; Muntasell, A. Antibody-Mediated Response of NKG2CbrightNK Cells against Human Cytomegalovirus. *J. Immunol.* **2015**, *194*, 2715–2724. [[CrossRef](#)]
41. Itell, H.L.; Nelson, C.; Martinez, D.R.; Permar, S.R. Maternal immune correlates of protection against placental transmission of cytomegalovirus. *Placenta* **2017**, *60*, S73–S79. [[CrossRef](#)]
42. Maidji, E.; McDonagh, S.; Genbacev, O.; Tabata, T.; Pereira, L. Maternal Antibodies Enhance or Prevent Cytomegalovirus Infection in the Placenta by Neonatal Fc Receptor-Mediated Transcytosis. *Am. J. Pathol.* **2006**, *168*, 1210–1226. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
43. Pereira, L.; Maidji, E.; McDonagh, S.; Tabata, T. Insights into viral transmission at the uterine-placental interface. *Trends Microbiol.* **2005**, *13*, 164–174. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
44. Pereira, L. Congenital Viral Infection: Traversing the Uterine-Placental Interface. *Annu. Rev. Virol.* **2018**, *5*, 273–299. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
45. Miescher, S.M.; Huber, T.M.; Kühne, M.; Lieby, P.; Snyderman, D.; Vensak, J.L.; Berger, M. In vitro evaluation of cytomegalovirus-specific hyperimmune globulins vs. standard intravenous immunoglobulins. *Vox Sang.* **2015**, *109*, 71–78. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
46. Lazzarotto, T.; Blázquez-Gamero, D.; Delforge, M.-L.; Foulon, I.; Luck, S.; Modrow, S.; Leruez-Ville, M. Congenital Cytomegalovirus Infection: A Narrative Review of the Issues in Screening and Management From a Panel of European Experts. *Front. Pediatr.* **2020**, *8*, 13. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
47. Rawlinson, W.D.; Boppana, S.B.; Fowler, K.B.; Kimberlin, D.W.; Lazzarotto, T.; Alain, S.; Daly, K.; Doutré, S.; Gibson, L.; Giles, M.; et al. Congenital cytomegalovirus infection in pregnancy and the neonate: Consensus recommendations for prevention, diagnosis, and therapy. *Lancet Infect. Dis.* **2017**, *17*, e177–e188. [[CrossRef](#)]

Annexe 5. Génération des inserts UL56 et UL89 pour la production de protéines recombinantes

Tableau 1 : Amorces et protocole d'amplification pour la génération des inserts UL56 et UL89 destinés à la production de protéines recombinantes.

Amorces	Séquence 5' → 3'
UL89-F-1	GGA GGA GGA ATG TTG CGC GGA GAC TCG GCC GCC AAG
UL89-F-2	GAAGATCTTC ATG CAC CAC CAC CAC CAC CAC GGA GGA GGA ATG TTG CGC GGA GAC
UL89-R	GAAGATCTTC CTA GCT GAC CCT GAA ACG GAT
UL56-F	GCTCTAGAGC ATG TAC CCA TAT GAC GTC CCT
UL56-R-1	GTG GTG GTG GCC CTG AAA ATA AAG ATT CTC ACC ACG CAG ACT ACC AGG CAC
UL56-R-2	GCTCTAGAGC CTA GTG GTG GTG GTG GTG GTG GCC CTG AAA ATA AAG ATT CTC ACC
Code couleur :	Site BglII ou XbaI, Codon Start ou Stop, Site de clivage TEV, TAG HISx6 ou TAG HA, Linker

▲ **START** ■ **HA x3** ■ **pUL56** ■ **TEV** ■ **HIS x6** ■ **STOP** ▲
XbaI site XbaI site

▲ **START** ■ **HIS x6** ■ **pUL89** ■ **STOP** ▲
BglII site BglII site

Protocole d'amplification : 5 min de dénaturation initiale à 98°C, 35 cycles composés de : 10 secondes à 98°C, 15 secondes à 55°C et de 2 minutes d'élongation à 72°C. Ces 35 cycles sont suivis de 5 minutes d'élongation finale à 72°C.

Le Mix PCR est composé de :

- 260-400 ng d'ADN
- 25µL PrimeStar® HS DNA Polymerase (TaKaRa, USA)
- 1,5 µL par amorce (10mM)
- qsp 50µL d'eau PPI

Tableau 2 : Amorces utilisées pour les PCR de criblage et le séquençage Sanger.

Amorces	Séquence 5' → 3'
UL89-2R	GGA TGA TGA ACC AAG TCT TGC
UL89-3F	GAT CCG CAG TTT CAG CAG AT
UL89-4R	CTG TCC GGT GCT TAA GAA CC
UL89-5F	TAG GCT TCC AGT CGA GCG T
UL89-6R	CCT CAG AAC TCT CGG AGA GGT
UL89-7F	ACA GCA CGC TCA ACA CCA AC
UL56-2R	ATA GGC TTT TGA GGG CCG A
UL56-3F	CCG TCA AGC CAG TCC GAT
UL56-4R	CCT CTG ACT GTG AGT ACT GCT GT
UL56-5F	GCA TAT TCT CGA GGA GAT TCG
UL56-6R	TTC TGC AGC ACG TTT AGG TC
UL56-7F	CTG CAC CGA TCG TTA TCC CCT

Annexe 6. Protocole de purification sur billes magnétiques Ni-NTA

1- Equilibration des billes

Remettre en suspension les billes d'agarose magnétique Ni-NTA en les agitant au vortex pendant 2 s. Prélever 100 μ L de billes et déposer dans un tube Eppendorff de 1,5 mL posé sur le portoir magnétique (PM). Après 3 minutes, retirer le tampon initial et ajouter 500 μ L de **tampon A**.

2- Mise en contact des billes avec le lysat cellulaire

Remettre en suspension les billes d'agarose magnétique Ni-NTA en les agitant au vortex pendant 2 s. Laisser 3 minutes sur le PM et retirer le tampon A. Ajouter 500 μ L de **lysat cellulaire** puis incuber une nuit à 4°C en agitation douce sur une roue tournante. Conserver une fraction 30 μ L de lysat dans un tube annoté L (lysat).

3- Fraction non retenue

Placer le tube sur le PM et laisser 3 minutes. Récupérer la fraction non retenue et conserver 30 μ L dans un tube annoté NR (non retenu).

4- Lavages

Ajouter 500 μ L de **tampon B**, resuspendre les billes par agitation douce sur une roue tournante pendant 5 minute puis placer le tube sur le PM. A effectuer 2x. A la fin de chaque lavage conserver une fraction de 30 μ L dans des tubes annotés W1 et W2 (Wash).

5- Elutions

Une fois les billes lavées et le tampon B retiré, ajouter 30 μ L de **tampon C**. Suspendre les billes par agitation douce sur une roue tournante pendant 5 minutes. Placer le tube sur le PM et laisser 3 minutes. Récupérer l'éluât et le conserver dans un tube annoté E1 (Eluât). Effectuer 3 éluations.

Les échantillons sont prêts pour être analysés.

Tampon A: 50mM NaH₂PO₄, 300mM NaCl, 10 mM Imidazole, pH 8 ; **Tampon B:** 50mM NaH₂PO₄, 300mM NaCl, 20 mM Imidazole, 0,005% Tween 20, pH 8 ; **Tampon C:** 50mM NaH₂PO₄, 300mM NaCl, 250 mM Imidazole, 0,005% Tween 20, pH 8

Annexe 7. Réactifs migration, coloration SDS-PAGE et western blot

Tampon de migration Tris-Glycine-SDS 10X (1L)

		Concentration finale
Tris Base	30,2g	25mM
Glycine	144g	192mM
SDS	10g	0,1%
H ₂ O	qsp 1L	

Gel acrylamide 12% pour 3 mini-gels Biorad 0,75 mM

Pour d'autres concentrations de gel, ajuster les quantités d'acrylamide et d'eau.

	Separating	Stacking
Acrylamide/bis- 37,5:1	30% 8 mL	0,83 mL
Tris-HCl	5 mL 1,5M pH8,8	0,630 mL 1M pH6,8
SDS 10%	200 µL	50 µL
H ₂ O	6,6 mL	3,4 mL
TEMED (avant-dernier)	20 µL	5 µL
APS 10% (dernier)	200 µL	50 µL

Tampon de charge Laemmli 5X (20 mL)

		Concentration finale
Tris 1M pH6,8	6,24 mL	62,5mM
Glycérol 87%	11,5 mL	10%
SDS	2,3 g	2,3%
bleu de bromophénol	une petite pointe	
H ₂ O	qsp 20 mL	

Solution de coloration au Bleu de Coomassie (1L)

Ethanol	460 mL
Acide Acétique	80 mL
H ₂ O qsp 1L	460 mL
Bleu Coomassie R250	2,5 g

Solution de décoloration

Ethanol	30%
Acide acétique	7,5%

TBS (Tris-Buffered Saline) 10X (1L)

Tris Base	24 g
NaCl	88 g
H ₂ O qsp 1L	
Adjust pH to 7.6 with 12 N HCl	

Étude des protéines du cytomegalovirus humain impliquées dans l'étape d'encapsidation en vue du développement de nouvelles thérapies

Le cytomegalovirus humain (CMVH) est pathogène opportuniste majeur en cas d'immunodépression et représente la principale cause d'infection congénitale d'origine virale. Bien qu'efficaces, l'utilisation des molécules antivirales conventionnelles est limitée par leur toxicité et l'émergence de résistances. Face à ces constats, il est nécessaire de développer de nouvelles thérapies. L'étape d'encapsidation de l'ADN viral est essentielle à la réplication du CMVH. Les protéines impliquées dans cette étape (pUL56, pUL89, pUL51, pUL52, pUL77, pUL93, pUL104) sont des cibles privilégiées par le degré de conservation et de spécificité chez les herpesvirus. Le développement récent du letermovir ciblant le complexe terminase (pUL56, pUL89 et pUL51) conforte ce choix. Cependant son mécanisme d'action exacte demeure inconnu et devant l'émergence de mutations à haut niveau de résistance il est nécessaire de poursuivre l'identification de nouvelles cibles thérapeutiques. Afin d'étudier le mécanisme d'action du letermovir et de mettre en évidence de nouvelles cibles au sein des protéines impliquées dans l'étape d'encapsidation, 3 axes de recherche ont été menés. (I) Etude de l'implication de pUL51 dans le mécanisme d'action du letermovir. Nous avons pu mettre en évidence son implication par la caractérisation d'une nouvelle mutation de résistance au letermovir (A95V) issue d'une souche isolée chez un patient traité. (II) Identification de nouvelles cibles thérapeutiques dans les protéines pUL51 et pUL52. Des approches bio-informatiques et expérimentales (production de virus recombinants et développement d'un inhibiteur peptidique) ont validé la présence d'un motif de type leucine-zipper dans la protéine pUL51 et des motifs de type CXXC et zinc-finger dans la protéine pUL52. Ces motifs, essentiels à la réplication virale, sont probablement impliqués dans la structure-fonction de ces protéines et ainsi représentent un point de départ possible pour le développement de nouvelles thérapies. (III) Production des protéines recombinantes pUL56 et pUL89 dans l'objectif d'explorer le mécanisme d'action du letermovir. Nous avons initié des travaux de production protéiques dans un système d'expression baculovirus-cellules d'insectes. Nos résultats démontrent la production de pUL89. Cependant sa purification et la production de pUL56 nécessitent encore des étapes d'optimisation. Ainsi, ce travail de thèse a permis d'identifier de nouvelles cibles potentielles afin de faciliter le développement de nouvelles thérapies anti-CMVH et d'améliorer la compréhension du mécanisme d'action du letermovir.

Mots-clés : Cytomegalovirus, encapsidation, complexe terminase, résistance, letermovir

Study of proteins involved in human cytomegalovirus DNA-packaging step for the development of new therapies

The human cytomegalovirus (HCMV) is a major pathogen for immunocompromised patients and fetus in utero. Despite their efficiency, the use of conventional antivirals is limited by their toxicity and the emergence of resistance. Thus, it is necessary to develop new therapies targeting other stages of viral replication. The viral DNA-packaging step is essential for HCMV replication. Proteins involved in this step (pUL56, pUL89, pUL51, pUL52, pUL77, pUL93, pUL104) are privileged targets due to their degree of conservation and specificity in herpesviruses. The recent development of letermovir targeting the terminase complex (pUL56, pUL89 and pUL51) supports this choice. However, its mechanism of action remains unknown and in view of the emergence of mutations with a high level of resistance, it is necessary to pursue the identification of new therapeutic targets. In order to study the mechanism of action of letermovir and to identify new targets within the proteins involved in the packaging step, 3 lines of research have been carried out. (I) Study of the involvement of pUL51 in the mechanism of action of letermovir. We were able to demonstrate its involvement by characterizing a new letermovir resistance mutation (A95V) from a strain isolated from a treated patient. (II) Identification of new therapeutic targets in the pUL51 and pUL52 proteins. Bioinformatics and experimental approaches (production of recombinant viruses and development of a peptide inhibitor) validated the presence of a leucine-zipper motif in the pUL51 protein and of CXXC and zinc-finger motifs in the pUL52 protein. These motifs, essential for viral replication, are probably involved in pUL51 or pUL52 structure-function and thus represent a possible starting point for the development of new therapies. (III) Production of recombinant proteins pUL56 and pUL89 in order to explore the mechanism of action of letermovir. We have initiated protein production in a baculovirus-insect cell expression system. Our results demonstrate the production of pUL89. However, its purification and the production of pUL56 still require optimization steps. Thus, this thesis work allowed us to identify new potential targets to facilitate the development of new anti-HCMV therapies and to improve the understanding of the mechanism of action of letermovir.

Keywords : Cytomegalovirus, DNA-packaging step, terminase complex, resistance, letermovir

