

UNIVERSITE DE LIMOGES

ECOLE DOCTORALE BIOLOGIE, SANTE ED n°524

FACULTE DE MEDECINE

Unité mixte de recherche 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 et Infectiologie

Cytomégalovirus humain, mutations de résistance, et nouvelles cibles thérapeutiques

Présentée et soutenue publiquement par

Gaëtan LIGAT

le 01 décembre 2017

Thèse dirigée par le Professeur Sophie ALAIN et le Docteur Sébastien HANTZ

JURY

Professeur François DENIS , PU-PH émérite, Université de Limoges	Président
Docteur Serge BOUAZIZ , DR CNRS, Université Paris Descartes	Rapporteur
Professeur Patrice MORAND , PU-PH, Université de Grenoble	Rapporteur
Professeur Jacques IZOPET , PU-PH, Université de Toulouse	Examineur
Docteur Marie-Christine MAZERON , MCU-PH, Université Paris Diderot	Examineur
Professeur Sophie ALAIN , PU-PH, Université de Limoges	Examineur
Docteur Sébastien HANTZ , MCU-PH, Université de Limoges	Examineur

UNIVERSITE DE LIMOGES

ECOLE DOCTORALE BIOLOGIE, SANTE ED n°524

FACULTE DE MEDECINE

Unité mixte de recherche 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 et Infectiologie

Cytomégalovirus humain, mutations de résistance, et nouvelles cibles thérapeutiques

Présentée et soutenue publiquement par

Gaëtan LIGAT

le 01 décembre 2017

Thèse dirigée par le Professeur Sophie ALAIN et le Docteur Sébastien HANTZ

JURY

Professeur François DENIS , PU-PH émérite, Université de Limoges	Président
Docteur Serge BOUAZIZ , DR CNRS, Université Paris Descartes	Rapporteur
Professeur Patrice MORAND , PU-PH, Université de Grenoble	Rapporteur
Professeur Jacques IZOPET , PU-PH, Université de Toulouse	Examineur
Docteur Marie-Christine MAZERON , MCU-PH, Université Paris Diderot	Examineur
Professeur Sophie ALAIN , PU-PH, Université de Limoges	Examineur
Docteur Sébastien HANTZ , MCU-PH, Université de Limoges	Examineur

« *The future belongs to those who believe in the beauty of their dreams.* »

- Eleanor Roosevelt –

A mes grands-parents,

A mes parents,

REMERCIEMENTS

*La **Thèse de Doctorat d'Université** représente un travail intense qui s'inscrit dans la durée, trois années, constituant une petite partie d'une vie, souvent riche en émotions. De nombreuses personnes se sont ainsi retrouvées de manière fortuite ou non, pour le meilleur et parfois pour le pire, à partager certain de ces moments avec le **doctorant, moi**. Ce sont tout particulièrement ces personnes que j'aimerais mettre en avant dans ces remerciements.*

*L'ensemble des **membres du jury** pour avoir pris le temps d'examiner mes travaux de doctorat. A monsieur le **Professeur François DENIS** (Université de Limoges), merci de m'avoir fait l'honneur d'être président de ce Jury. Veuillez trouver ici mon profond respect. A monsieur le **Docteur Serge BOUAZIZ** (Université Paris Descartes) et à monsieur le **Professeur Patrice MORAND** (Université de Grenoble). Merci de m'avoir fait l'honneur d'être rapporteur et ainsi de juger ce manuscrit. A monsieur le **Professeur Jacques IZOPET** (Université de Toulouse) et à madame le **Docteur Marie-Christine MAZERON** (Université Paris Diderot). Merci à vous d'avoir accepté de prendre connaissance de mon travail et de le juger en tant qu'examineurs.*

*Ce travail n'aurait pas été possible sans le soutien financier de l'**Université de Limoges**, de l'**Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale (Inserm)**, du **Centre National de Référence des Cytomégalo virus** et du **Centre Hospitalier Universitaire de Limoges**.*

*Madame le **Professeur Marie-Cécile PLOY**, directrice de notre UMR Inserm, merci pour votre inconditionnel soutien dans toutes mes démarches, pour votre dynamisme. Merci pour votre sympathie et votre confiance. Soyez assurée de mon amitié et de ma reconnaissance.*

*Je tiens à remercier madame le **Professeur Véronique BLANQUET** (UMR INRA 1061 - Université de Limoges), directrice de l'institut GEIST, pour votre confiance et votre écoute. Ce fut un réel bonheur d'apprendre avec vous. Monsieur le **Docteur Bertrand COURTIOUX** (UMR*

Inserm 1094 - Université de Limoges), directeur de l'école doctorale « Bio-santé », merci pour votre sympathie, votre écoute et vos conseils. Avoir pu assister aux conseils de l'institut GEIST et de l'école doctorale en tant que représentant des doctorants fut une réelle opportunité très enrichissante. Merci de m'avoir fait confiance.

*Merci aux membres de l'équipe pédagogique du département « Microbiologie » de la Faculté de Pharmacie et plus particulièrement, madame le **Professeur Sylvie ROGEZ**, madame le **Docteur Sylvie DELEBASSE**, madame le **Docteur Jeanne COOK-MOREAU**, madame **Roselyne MOUZET**. Enseigner à vos côtés a été une réelle expérience humaine, très enrichissante. Merci pour votre confiance.*

*Merci à monsieur **Didier DELOURME** et à monsieur **Patrick PELISSIER** (UMR Inra 1061 - Université de Limoges) pour leur disponibilité et les conseils qu'ils ont su me donner lors de mes premiers stages dans le monde universitaire. Un grand merci à madame **Laure BREMAUD** (UMR Inra 1061 - Université de Limoges), tout a commencé en première année de Licence, en 2009, et depuis vous m'avez toujours suivi. Je vous remercie pour votre confiance. Vous êtes la première personne à avoir cru en moi et j'espère que vous serez fière de ce travail. Soyez assurée de ma reconnaissance et de mon amitié. Je n'oublie pas, un jour, peut-être avec vous, j'irai découvrir la Jordanie à la rencontre des Oryx.*

***Anne DRUILHE**, **Sandrine LE NOIR** et **Claire CARRION** (UMR CNRS 7276 - Université de Limoges). Merci à vous de m'avoir fait découvrir le monde de la « diffusion scientifique ». La « Fête de la Science », l'atelier « immunoludique », resteront de réelles expériences humaines. Je me suis autant évadé que « nos petits ».*

***Isabelle**, **Charlotte**, et plus récemment **Emmanuelle**, secrétaires toujours disponibles. Merci du temps consacré lors de chaque « mission », et de votre patiente. Merci à toi **Adeline**, pour ton dévouement à l'Ecole Doctorale « Bio-Santé ». Merci à **Valérie** et **Virginie**, tout a commencé aux inscriptions de la Faculté des Sciences et Techniques, j'ai apprécié nos discussions.*

Merci à monsieur **Patrick TROUILLAS** (UMR Inserm 850 - Université de Limoges). Merci de m'avoir permis de participer aux différentes réunions sur la « Pol ». Ce fut enrichissant de travailler, d'échanger avec vous mais aussi avec vos collaborateurs de République Tchèque.

Gaël qui a initié les travaux d'étude structurale des protéines virales, **Anthony** pour son travail effectué en amont, ses hypothèses, ses idées, sa disponibilité, nos longues discussions sur « messenger », ses « tutos » sur l'utilisation de « Pymol ». Merci de m'avoir donné de ton temps.

Bien évidemment, je remercie profondément tous les membres de l'UMR 1092 côtoyés pendant ces quelques années. **Olivier**, merci pour tes conseils. Merci d'avoir cru en moi. J'ai aimé nos discussions le soir quand le labo est presque « vide », tu as été mon confident, merci pour ton écoute et ton amitié. **Thomas**, merci pour nos discussions. J'ai une grande admiration pour toi et ta capacité de travail. Une chose est sûr, nous avons en commun notre passion pour notre métier. Je suis très heureux pour toi et pour notre labo que tu puisses y rester. C'est une chance pour notre unité. **Sandra** pour avoir fait preuve de disponibilité, pour tes conseils et ton esprit critique. Maman **Martine** (et tes chocolats), **Nicolas, Sophie R., Fabien, Christian, Elena, Elodie, Déborah, Yohann, Emilie, Valentin, Rémi** (la team séquençage). J'aimerais également remercier **Val**, une coach d'anglais, toujours le sourire et qui sait nous faire voir la vie du bon côté. Promis, « now, I will take time for myself ». Mes stagiaires, **Chloé, Quentin, Camille, Tiffany, Mathilde**, merci pour votre travail et votre implication. Vous avez contribué à ce résultat. J'espère sincèrement vous avoir transmis ma passion

Pierrette, ma « chouchou », merci pour tous nos moments passés ensemble, ton sourire me manque. Je suis très content de t'avoir fait découvrir certaines spécialité culinaire française. Merci d'avoir été présente même après ton départ du labo.

Claire D.S., avant tout une interne, puis une stagiaire, et enfin une véritable amie. Nos soirées « restos », nos discussions, notre inoubliable week-end en Normandie. Merci d'être là, merci d'être qui tu es.

Margaux, Mélissa. *Désolé, vous n'avez pas votre page, mais vous avez un paragraphe rien qu'à vous. Qu'aurais été ces trois années sans votre présence, votre écoute, votre soutien.*

Margaux, *j'ai beaucoup de choses à te dire, mais parfois les mots ne peuvent pas exprimer les idées, mais j'essayerai quand même. Ta connaissance est l'une des meilleures choses qui m'est arrivée durant toute ces trois années. Je suis également fier de t'avoir aidé à « réviser » pour l'obtention de ton poste, j'en suis très heureux pour toi et pour l'unité.*

Margaux, Mélissa, *vous faites parties, sans aucun doute, de mes plus belles rencontres sur ces trois années de doctorat.*

Margaux, Emilie S., *n'oublions pas notre « Juju », « sur les bords du lac ».*

Lilian, *stagiaire, voisin, je me permets de reprendre ta phrase, elle nous va si bien, « merci pour ces moments passés à déguster différents produits provenant de la fermentation du moût de raisins noirs ».*

Clémentine, *une réelle amitié est née.*

Aux membres du bureau « ADPLim » et aux chimistes rencontrés, pour nos soirées, nos « réunions ».

Emilie P., Lauréna, Loïc, *mes « vieux amis ».* *Que dire. Restez comme vous êtes. Je suis fier de vous.*

Charline, Manon, Elodie, Lucie H., Julie, Jérémy, Emilie L., Vanessa, *que vous soyez des amis de longues dates ou plus récemment rencontrés sur les bancs de la Fac. Merci pour tous ces moments partagés ensemble.*

Roxane, *mon binôme de toujours, pour tous les moments partagés ensemble durant ces dernières années et les heures passées à discuter des « manips » ou pas. Notre week-end à Londres, Indochine. Dans deux ans, je serais là pour te soutenir quand tu écriras, à ton tour, ton manuscrit.*

Je tiens également à remercier ma famille, Catherine, Bruno, Antonin, Lilian. Merci pour nos week-end à la Faute, ces moments qui ressourcent.

Jean-Marc, Evelyne, Pascale, Jean-Pierre, Caroline. *Merci à toi Lucie L., je suis très heureux des moments passés ensemble.*

*Je tiens à remercier tout particulièrement, et mes mots ne seront pas suffisants, mes directeurs de thèse, madame le **Professeur Sophie ALAIN** et monsieur le **Docteur Sébastien HANTZ**. Je vous témoigne toute ma gratitude et ma reconnaissance pour votre amitié, votre confiance et votre soutien sans faille dans mes projets, mes envies et mes idées. L'autonomie et la confiance sont sans aucun doute une belle forme d'apprentissage. Merci également de m'avoir permis de communiquer mes résultats dans différents congrès. Brisbane restera un de mes meilleurs souvenirs sur ces trois années avec vous. Sans oublier les bières d'Hambourg et nos discussions pas toujours scientifiques. Je n'aurais pas pu rêver meilleurs directeurs de thèse. Ce travail, c'est notre travail. J'espère que vous serez fiers de ce que nous avons accompli ensemble.*

*Mes derniers remerciements iront sans aucun doute à mes proches, **Pierre**, mes **grands-parents** et enfin mes **parents**, sans qui tout ça n'aurait pas été possible, qui m'ont inculqué la volonté d'arriver au bout de mes envies. Merci de m'avoir fait confiance, de m'avoir soutenu. Ce travail correspond à l'aboutissement d'une partie de votre éducation. Merci pour avoir fait de moi ce que je suis aujourd'hui.*

« Soyons reconnaissants aux personnes qui nous donnent du bonheur ; elles sont les charmants jardiniers par qui nos âmes sont fleuries. »

- Marcel Proust -

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 a été réalisé sous la direction du Pr. Sophie ALAIN et du Dr. Sébastien HANTZ au sein du laboratoire « *Anti-infectieux : supports moléculaires des résistances et innovations thérapeutiques* », UMR Inserm 1092, Université de Limoges, CHU de Limoges dirigé par le Pr. Marie-Cécile PLOY. Ce projet de doctorat a été financé par l'Université de Limoges, l'Institut National de Santé et de la Recherche Médicale (Inserm), le Centre National de Référence des Cytomégalovirus (CNR CMV) et le Centre Hospitalier Universitaire de Limoges.

Brevet (Inserm transfert) :

Déclaration d'invention déposée auprès de l'Office Européen des Brevets

Numéro de dépôt : EP17305987.4

Date de dépôt : 24-07-2017

Antibodies and peptides to treat HCMV related diseases

Publications :

Articles parus ou soumis dans des revues internationales à comités de lecture :

Ligat, G., Jacquet, C., Chou, S., Couvreur, A., Alain, S., and Hantz, S. (2017). Identification of a short sequence in the HCMV terminase pUL56 essential for interaction with pUL89 subunit. *Sci. Rep.* 7, 8796.

Andouard, D., Mazon, M-C., Ligat, G., Couvreur, A., Pouteil-Noble, 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.

Ligat, G., Cazal, R., Hantz, S., Alain, S. Human cytomegalovirus terminase complex as an antiviral target, a close-up view. *FEMS Microbiol Rev.*, Invited review, Under Review.

Articles en préparation :

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.

Ligat, G., Da Re, S., Alain, S., Hantz, S. Identification of essential residues in the HCMV helicase-primase complex for viral replication.

Communications :

Communications affichées soumises à comité de lecture :

Ligat, G., Alain, S., Hantz, S. (Octobre 2016). Identification of the ATP-binding site of the helicase subunit pUL105 of human cytomegalovirus. 6^{ème} Congrès Européen de Virologie (ECV) (Hambourg, Allemagne). Poster n°6-5.

Ligat, G., Jacquet, C., Cazal, R., Couvreur, A., Alain, S., Hantz, S. (Janvier 2016). Mise en évidence de motifs essentiels à la réplication virale au sein de pUL56, protéine du complexe terminase du cytomegalovirus humain. 2^{ème} Journée Recherche Tours-Poitiers-Limoges (Limoges, France). Poster n° 64.

Ligat, G., Couvreur, A., Champier, G., Hantz, S., Alain, S. (Décembre 2015). Mise en évidence d'un motif doigt de zinc de la sous unité pUL56 du complexe terminase du CMV essentiel à la

réplication virale. 35^{ème} Réunion Interdisciplinaire en Chimiothérapie Anti-Infectieuse (RICAI) (Paris, France). Poster n° 453.

Ligat, G., Couvreur, A., Champier, G., Hantz, S., Alain, S. (Septembre 2015). Identification of a metal-binding motif in the HCMV terminase protein essential for viral replication. Journée de l'institut Génomique, Environnement, Immunité, Santé et Thérapeutiques (GEIST) (Limoges, France). Poster n° 35.

Ligat, G., Couvreur, A., Champier, G., Hantz, S., Alain, S. (Avril 2015). Identification of a metal-binding motif in the HCMV terminase protein essential for viral replication. 5^{ème} Conférence Internationale sur l'Infection Congénitale à Cytomégalovirus et 15^{ème} Workshop International sur le Cytomégalovirus et les Herpès virus (Brisbane, Australie). Poster n° 50.

Communications orales soumises à comité de lecture :

Ligat, G., Alain, S., Hantz, S. (Juillet 2017). Highlighting an ATP-binding site in helicase pUL105 crucial for HCMV replication. Journées d'animation scientifique de la FÉRI (Fédération de Recherche en Infectiologie) (Tours, France).

Ligat, G., Jacquet, C., Cazal, R., Couvreur, A., Champier, G., Alain, S., Hantz, S. (Mars 2016). Etude structure-fonction de pUL56, nouvelle cible du CMVH. Congrès de la Société Française de Microbiologie (Paris, France).

Ligat, G., Jacquet, C., Cazal, R., Couvreur, A., Hantz, S., Alain, S. (Octobre 2015). Mise en évidence d'un motif de type LAGLIDADG de la sous-unité pUL56 du complexe terminase du CMV, essentiel à la réplication virale. Journées d'animation scientifique de la FÉRI (Fédération de Recherche en Infectiologie) (Orléans, France).

Encadrements :

Master 2 Recherche

Janvier - Juin 2017 : Chloé JACQUET, Master 2 Recherche Physiologie, Neurosciences, Biologie Cellulaire et Moléculaire, Université de Poitiers.

« Etude des interactions entre les protéines du complexe d'encapsidation du cytomégalo virus humain ».

Master 1

Avril - Juin 2017 : Mathilde ESTREGUIL, Master 1 Sciences de la Vie et de la Santé, Université de Limoges.

« Production de virus recombinants par mutagenèse « en passant » grâce à la technologie des BAC ».

Avril - Juin 2015 : Chloé JACQUET, Master 1 Sciences de la Vie et de la Santé, Université de Limoges.

« Etude d'un potentiel motif LAGLIDADG de la sous-unité pUL56 du complexe terminase ».

Diplôme Universitaire de Technologie (DUT)

Mai - Juin 2015 : Quentin DESSABLES, DUT Analyses Biologiques et Biochimiques, IUT de La Rochelle.

« Résistances du CMVH aux antiviraux : Analyses des mutations de la protéine virale pUL97 ».

Brevet de Technicien Supérieur (BTS)

Janvier - Février 2017 : Tiffany MAURIN, BTS Biotechnologies, Lycée Simone Weil, Le Puy.

« Production de virus recombinants par mutagenèse « en passant » grâce à la technologie des BAC ».

Janvier - Février 2016 : Camille BOUDARIAS, BTS Biotechnologies, Lycée Simone Weil, Le Puy.

« Résistances du CMVH aux antiviraux : Analyses des mutations de la protéine virale pUL54 ».

ABREVIATIONS

Abréviations	Définitions
ACV	Aciclovir
AD169	Souche de cytomégalovirus humain de référence
ADN	Acide désoxyribonucléique
ARN	Acide ribonucléique
ATP	Adénosine triphosphate
ATU	Autorisation temporaire d'utilisation
BAC	Chromosome bactérien artificiel
BDCRB	2-bromo-5,6-dichloro-1-(β -D-ribofuranosyl)benzimidazole
CDV	Cidofovir
CI50	Concentration d'un antiviral inhibant 50% de la réplication virale
CI90	Concentration d'un antiviral inhibant 90% de la réplication virale
CMVH	Cytomégalovirus humain
D-	Donneur séronégatif
D+	Donneur séropositif
E	« <i>Early</i> » ou gènes précoces
EBV	Virus d'Epstein Barr
ECP	Effet cytopathique
EGFR	Récepteur de l'EGF (Epidermal Growth Factor)
Exo	Exonucléase
FOS	Foscarnet
gB, gH, gM/N et gL	Glycoprotéines
GCV	Ganciclovir
g	Gramme
HEK	« <i>Human embryonic kidney</i> »
HHV	Herpès virus humain
HSV	Herpès simplex virus
IE	« <i>Immediate Early</i> » ou gènes très précoces
IgG, IgM	Immunoglobulines

IL	Interleukine
IS50	Indice de sensibilité à 50%
L	« <i>Late</i> » ou gènes tardifs
LCS	Liquide cérébro-spinal
LIR	« <i>Long Internal Repeat</i> »
LTR	« <i>Long Terminal Repeat</i> »
MAPk	MAP kinases
mC-BP	Protéine mineure de fixation
mCP	Protéine mineure de capsid
MCP	Protéine majeure de capsid
mg	Milligramme
Mg	Magnésium
Mn	Manganèse
MRC-5	Fibroblastes humains
NFκB	« <i>Nuclear factor-kappa B</i> »
NLS	Signal de localisation nucléaire
<i>pac</i>	« <i>Cis-acting packaging element</i> »
pb	Paire de bases
R-	Receveur séronégatif
R+	Receveur séropositif
RPE-1	« <i>Retinal Pigmented Epithelial</i> »
SCID	« <i>Severe combined immuno deficiencie</i> »
SCP	Petite protéine de capsid
SIDA	Syndrome d'immunodéficience acquise
SIR	« <i>Short Internal Repeat</i> »
STR	« <i>Short Terminal Repeat</i> »
TCRB	2,5,6-trichloro-1-(β-D-ribofuranosyl)benzimidazole
VGCV	Valganciclovir
VZV	Virus de la varicelle et du zona
WT	<i>Wild-type</i>
Zn	Zinc

TABLE DES MATIERES

PREAMBULE	1
ETUDE BIBLIOGRAPHIQUE	3
INFECTION A CMVH	5
Physiopathologie	5
Infection chez le sujet immunodéprimé	7
Infection congénitale	9
DIAGNOSTIC DE L'INFECTION A CMVH.....	10
GENERALITES SUR LE CYTOMEGALOVIRUS HUMAIN.....	13
Structure du virus et du génome	13
Mécanisme de réplication.....	17
TRAITEMENTS ET MECANISMES DE RESISTANCES	28
PERSPECTIVES THERAPEUTIQUES	38
VERS UN VACCIN EN PROPHYLAXIE	42
NOUVELLES CIBLES THERAPEUTIQUES	43
Exploration du complexe terminase.....	43
Exploration du complexe hélicase-primase	78
OBJECTIF DE L'ETUDE.....	81
ETUDE EXPERIMENTALE	83
ANALYSES DE MUTATIONS DE RESISTANCES	84
Caractérisations de mutations de résistance	84
<i>Caractérisation de mutations de pUL54 : bénéfiques et limites d'une analyse à partir d'un modèle 3D</i>	<i>84</i>
<i>Caractérisation de nouvelles mutations détectées au sein de la polymérase pUL54 et de la kinase pUL97.....</i>	<i>108</i>
ANALYSES DE NOUVELLES CIBLES THERAPEUTIQUES	112
Etude du complexe terminase.....	118
<i>Mise en évidence de motifs essentiels à la réplication virale au sein de la sous-unité pUL56</i>	<i>118</i>
<i>Identification d'un domaine au sein de pUL56 nécessaire à son interaction avec pUL89</i>	<i>145</i>
Etude du complexe hélicase-primase	156
<i>Mise en évidence de motifs essentiels à la réplication virale au sein de l'hélicase et de la primase du CMVH....</i>	<i>156</i>

DISCUSSION ET PERSPECTIVES	179
REFERENCES	195
ANNEXES	210

TABLE DES ILLUSTRATIONS

Figure 1 : Physiopathologie de l'infection à CMVH.....	4
Figure 2 : Transmission materno-fœtale du CMVH.....	8
Figure 3 : Structure du CMVH	12
Figure 4 : Du génome complet au site de clivage.....	14
Figure 5 : Expression et fonctions des gènes viraux lors du cycle de réplication viral.....	15
Figure 6 : Cycle de réplication du CMVH	16
Figure 7 : Mécanisme d'entrée du CMVH.....	17
Figure 8 : Structure théorique de la polymérase virale pUL54 représentée en mode « cartoon »	19
Figure 9 : Mécanisme d'encapsidation et complexe terminase	21
Figure 10 : Différents types de capsides observés en microscopie électronique	22
Figure 11 : Régions conservées de la sous-unité pUL56 du complexe terminase.....	23
Figure 12 : Régions conservées de la sous-unité pUL89 du complexe terminase.....	24
Figure 13 : Mécanisme d'action des principales molécules anti-CMV	27
Figure 14 : Structure chimique des principales molécules anti-CMVH utilisées en clinique et de leurs analogues	30
Figure 15 : Cinétique de l'émergence de souches résistantes.....	33
Figure 16 : Carte des mutations de résistance de la kinase virale pUL97	34
Figure 17 : Carte des mutations de résistance de la polymérase virale pUL54	35
Figure 18 : Place du complexe hélicase-primase dans le mécanisme de réplication virale .	77
Figure 19 : Structure des trois sous-unités du complexe hélicase-primase de l'HSV-1 (pUL52, pUL8 et pUL5)	77

Figure 20 : Impact de mutations de la polymérase virale pUL54 sur la réplication du CMVH
..... 110

**Figure 21 : Impact des mutations F342Y et H393Y de la kinase virale pUL97 sur la
réplication du CMVH..... 111**

Figure 22 : Diagramme de Venn des vingt acides aminés naturels..... 114

TABLE DES TABLEAUX

Tableau I : Molécules en cours de développement	37
Tableau II : Vaccins en cours de développement.....	41
Tableau III : Motifs putatifs identifiés dans les gènes du complexe hélicase-primase du CMVH	80
Tableau IV : Mutations au sein de la polymérase pUL54	107
Tableau V : Mutations au sein de la kinase pUL97	107
Tableau VI : Listes des vingt acide aminés naturels avec leurs codes à une et trois lettres	117

PREAMBULE

Dès 1904, des inclusions cytoplasmiques et nucléaires ont été observées dans des cellules anormalement volumineuses de certains organes comme les poumons, le foie ou le rein d'enfants morts nés dit atteints de « *maladie des inclusions cytomégaliqes* ». Néanmoins, ce n'est qu'en 1956 que l'agent responsable de cette maladie, nommé cytomégalovirus, fut isolé sur des cultures de fibroblastes humains.

L'étude génomique et structurale du cytomégalovirus humain (CMVH) a par la suite permis de le classer dans la famille des *Herpesviridae*. Cette famille comporte près de 120 herpès virus et regroupe notamment de nombreux virus connus du grand public comme l'herpès simplex de type 1 et de type 2 (HSV-1 et HSV-2), le virus de la varicelle et du zona (VZV) ou encore le virus d'Epstein Barr (EBV), agent de la mononucléose infectieuse.

Des alignements de séquences nucléotidiques et protéiques ont permis de classer cette famille virale en trois sous-familles, les *Alphaherpesvirinae*, les *Betaherpesvirinae* et les *Gammaherpesvirinae*. Le CMVH, également dénommé herpès virus humain 5, appartient à la sous-famille des *Betaherpesvirinae*.

Le CMVH est un virus ubiquitaire infectant 50 à 100% de la population dans le monde. La primo-infection, souvent asymptomatique chez l'immunocompétent, est suivie d'une phase de latence. Néanmoins, suite à une réactivation, le CMVH devient un pathogène opportuniste chez les sujets immunodéprimés, receveurs de greffes ou patients atteints du SIDA. Il représente aussi la principale cause d'infection congénitale d'origine virale. Le CMVH représente donc un problème majeur de santé publique.

Bien qu'efficaces, les antiviraux actuellement utilisés en clinique, tous inhibiteurs de l'ADN polymérase virale pUL54, sont peu nombreux, présentent une toxicité hématologique et rénale, entraînent l'émergence de mutations de résistance. Par ailleurs, de par leur toxicité, l'utilisation de ces molécules est limitée chez la femme enceinte et ne peut s'envisager qu'au cas par cas. Par ailleurs, la prévention de l'infection à CMVH par vaccination n'est à ce jour pas réalisable.

Des molécules sont en cours de développement avec une meilleure biodisponibilité orale et une moindre toxicité. Le letermovir, molécule en cours d'évaluation dans des essais cliniques, cible une étape exclusivement virale, l'encapsidation du génome. Cette molécule visant à prévenir l'apparition d'infection à CMVH dans le cadre de greffes donne de bons résultats. Néanmoins, son mécanisme d'action n'est toujours pas connu. Par ailleurs, jusqu'à présent, peu d'informations structurales et fonctionnelles sont disponibles concernant ces diverses cibles thérapeutiques.

Notre travail de doctorat s'inscrit dans ce contexte, avec comme objectif, à terme, de développer de nouvelles approches antivirales contre le CMVH. Ainsi, dans ce manuscrit et après une étude bibliographique, nous présenterons les différents résultats issus d'études bio-informatique, d'homologie structurale, de biologie moléculaire, biochimique et cellulaire. Une première partie a eu pour objectif de caractériser de nouvelles mutations identifiées chez des patients ne répondants plus aux différents traitements et non décrites à ce jour. La deuxième partie de notre travail de doctorat a porté sur la relation structure-fonction de deux complexes protéiques du CMVH ; le complexe terminase et le complexe hélicase-primase.

ÉTUDE BIBLIOGRAPHIQUE

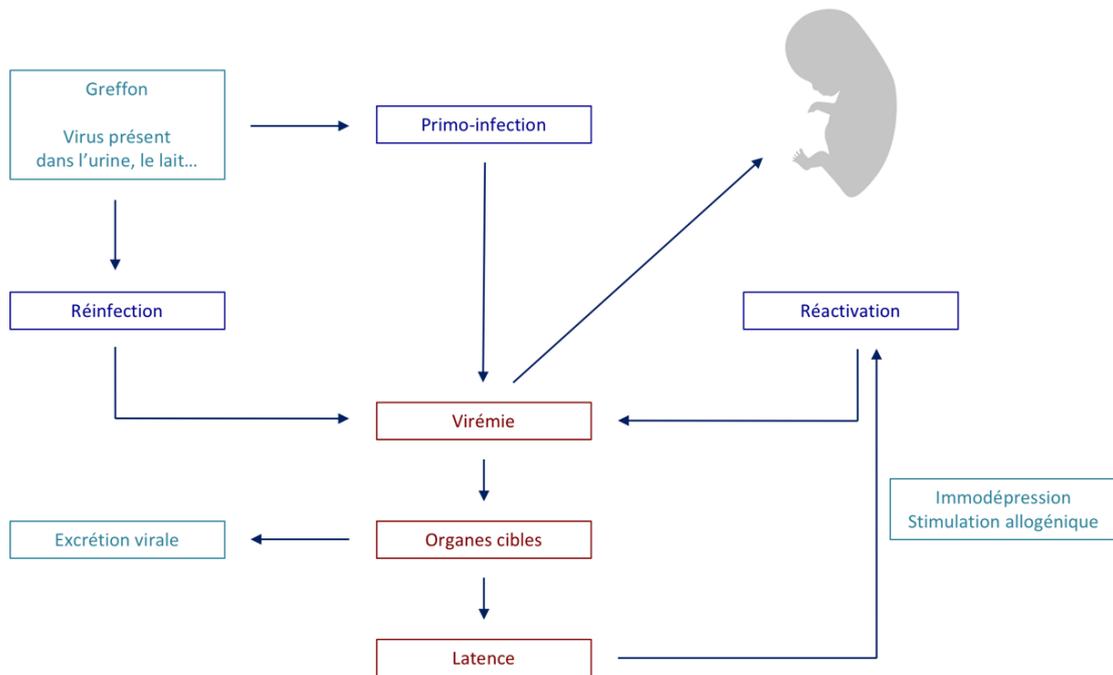


Figure 1 : Physiopathologie de l’infection à CMVH. Adapté de Mazon et al., 2015. L’acquisition du CMVH par des contacts directs (voie sexuelle, greffes d’organes ou de moelles, transfusion sanguine, lait maternel) est suivie d’une phase de dissémination sanguine (virémie) permettant au virus d’atteindre ses organes cibles. Suite à cette virémie, le virus persiste à l’état latent chez l’hôte pendant de nombreuses années. Néanmoins, différents stimuli comme une immunodépression ou une stimulation allogénique peuvent conduire à une réactivation et aboutir à une nouvelle virémie.

INFECTIONS A CMVH

Au moins 50% de la population mondiale a déjà rencontré le CMVH avec une prévalence variable en fonction du pays et des conditions socio-économique. L'âge moyen d'infection est variable selon les pays mais intervient généralement dans l'enfance. Le CMVH se transmet par des contacts directs, via des liquides biologiques de sujets excréteurs du virus et aboutit dans la majorité des cas à une infection asymptomatique se poursuivant par une phase de latence. Néanmoins, le virus garde la capacité de se réactiver au cours de la vie de l'individu.

PHYSIOPATHOLOGIE

In vivo, le tropisme cellulaire du CMVH est très varié. En effet, le CMVH présente la capacité de se répliquer dans les cellules fibroblastiques, les cellules endothéliales, les cellules épithéliales, les cellules musculaires, les cellules nerveuses et dans les macrophages lui permettant ainsi d'infecter un nombre important de tissus et d'organes (**Sinzger et al., 1995**). Ce large tropisme explique la diversité des signes cliniques rencontrés.

Le CMVH est acquis par voie hématogène (transplantation ou transfusion de produits sanguins) ou pénètre au niveau des muqueuses et se répand dans la circulation sanguine afin d'atteindre ses cellules cibles où le passage pourra notamment se faire de cellules à cellules. La dissémination du virus se fait principalement par l'infection des cellules endothéliales, monocytes, macrophages et polynucléaires. La sécrétion de cytokines comme l'interleukine-8 (IL-8) par les cellules endothéliales permet le recrutement des polynucléaires. En effet, les cellules endothéliales transmettent le virus aux monocytes et macrophages qui peuvent à leur tour le transmettre à des cellules non infectées (**Bentz and Yurochko, 2008**) (**Mazeron et al., 2015**) (**Figure 1**).

Après la primo-infection, le CMVH persiste au sein de l'hôte. De nombreux organes hébergent le virus à l'état latent. Néanmoins, la latence s'établit préférentiellement dans les monocytes et les macrophages mais aussi dans les cellules endothéliales. Les mécanismes de

maintien du virus en latence restent à ce jour très peu connus. Le système immunitaire de l'hôte joue un rôle important dans le processus de latence mais également dans la réactivation du virus. En effet, une immunodépression ou une stimulation allogénique peuvent conduire à une réactivation et aboutir à une nouvelle virémie **(Söderberg-Nauclér et al., 1997) (Sinclair and Sissons, 2006) (Sinclair, 2008) (Figure 1)**. L'infection par le CMVH passe très souvent inaperçue chez des individus immunocompétents. Son pouvoir pathogène, le plus souvent discret, se manifeste surtout chez des patients dont les défenses immunitaires ont été affaiblies, tels que les patients infectés par le VIH au stade de SIDA ou encore les patients traités par immunosuppresseurs. En outre, une primo-infection chez la femme enceinte peut provoquer de multiples lésions chez le fœtus. Ce virus est en effet la première cause d'infection congénitale d'origine virale.

La transmission survient après des contacts directs par le biais de la salive **(Pass and Hutto, 1986)**, des larmes **(Pass et al., 1982)**, des urines **(Pass et al., 1982)**, du sperme **(Bresson et al., 2003) (Kapranos et al., 2003)**, du lait maternel **(Nelson and Demmler, 1997)**, des sécrétions génitales, par transplantation ou transfusion de produits sanguins. L'infection post-natale a lieu en cas d'allaitement ou directement lors de l'accouchement.

INFECTION CHEZ LE SUJET IMMUNODEPRIME

L'infection à CMVH survient chez près de 75% des patients transplantés d'organes. Il représente l'agent pathogène le plus fréquemment rencontré. Pendant l'année qui suit une transplantation, 50 à 70% des patients présentent une primo-infection ou une réactivation **(Rubin, 2000) (Pereyra and Rubin, 2004)**.

Comme les autres herpès virus, le CMVH est à l'origine d'infections latentes pouvant se réactiver suite à des altérations du système immunitaire provoquées par les traitements immunosuppresseurs. Un greffon transplanté peut contenir du virus à l'état latent et aboutir à une infection à CMVH du receveur séronégatif (D+/R-) ou séropositif (D+/R+). Ainsi, un patient receveur séronégatif pour le CMVH (R-) peut présenter une primo-infection ou une réactivation exogène. En effet, l'infection chez le patient transplanté peut aussi provenir d'une transfusion ou d'une réactivation d'une infection antérieure.

Une primo-infection a lieu quand le receveur est CMVH négatif (R-) et le donneur du greffon CMVH positif (D+). Dans ce cas, le risque relatif d'infection à CMVH est vingt fois plus élevé que dans la combinaison D-/R-. Un receveur CMVH positif (R+) peut présenter une réinfection par une autre souche provenant d'un donneur positif (D+). La réinfection, plutôt rare, est moins sévère que la primo-infection. Après une greffe d'organe, des facteurs de risque d'infection à CMVH ont été évalués. Ainsi, le taux d'infection le plus élevé survient lorsque le receveur est séronégatif pour le CMVH et reçoit un organe séropositif pour le CMV (D+/R-). Dans les cas (D+/R+) et (D-/R+), le risque relatif d'une infection à CMVH est intermédiaire.

Dans la majorité des cas, un patient infecté par le VIH est co-infecté par le CMVH. La réactivation endogène est favorisée par l'immunodépression et apparaît lorsque les lymphocytes CD4+ sont inférieurs à 100/mm³. Depuis la fin des années 1990, l'incidence de l'infection par le CMVH a été divisée par deux grâce à la généralisation des trithérapies anti-rétrovirales.

Bien qu'à ce jour des traitements existent pour lutter contre une infection à CMVH, elle reste cependant associée à une augmentation de la mortalité et de la morbidité après transplantation et à une diminution de la survie du greffon **(Hodson et al., 2005)**.

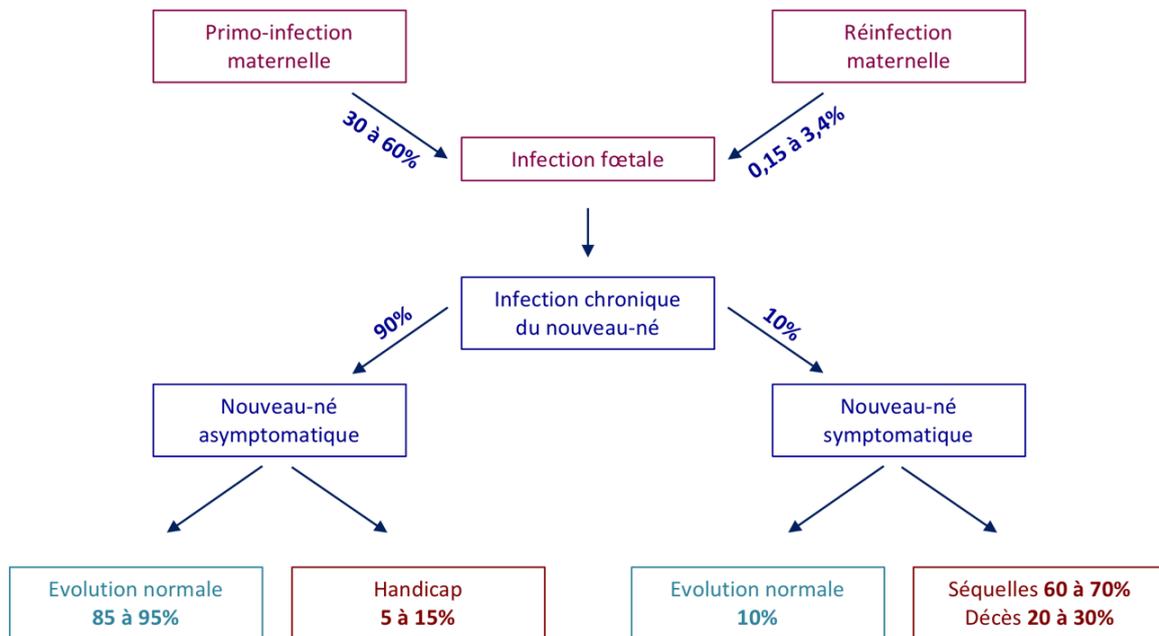


Figure 2 : Transmission materno-foetale du CMVH. Adapté de Mazon et al., 2015. La primo-infection maternelle représente un risque important d'infection du fœtus pendant la grossesse (30 à 60%). La majorité des enfants asymptomatiques (90%) présentent une évolution normale. Les nouveau-nés symptomatiques (10%) présenteront un tableau clinique important et variable pouvant aller jusqu'au décès (20 à 30%).

INFECTION CONGENITALE

Le CMVH représente la première cause d'infection congénitale virale dans le monde. Alors que dans les pays industrialisés la prévalence est de 0,3 à 1,2%, elle est plus difficile à évaluer dans les pays en voie de développement. Néanmoins, on estime que 1% des enfants dans le monde sont infectés par le CMVH *in utero*.

La primo-infection dans les trois premiers mois de la grossesse représente un risque sérieux pour le fœtus (risque de passage estimé entre 30 et 60%). La transmission du virus se fait de la mère à l'enfant à travers le placenta. Les enfants infectés *in utero* se développent normalement dans la majorité des cas. Néanmoins, ils peuvent présenter des séquelles notamment des pertes d'audition, des microcéphalies, des retards psychomoteurs, des retards mentaux voire décéder (**Figure 2**).

L'infection de la femme enceinte par le CMVH est souvent corrélée à un contact avec de jeunes enfants qui excrètent, souvent de façon abondante, du virus dans la salive et l'urine. L'exposition est d'autant plus forte que les femmes sont en contact avec des enfants en bas âge, notamment en crèches.

L'infection d'un enfant après la naissance est dans la majorité des cas asymptomatique et n'entraîne pas d'anomalies du développement.

DIAGNOSTIC DE L'INFECTION A CMVH

La recherche du CMVH a pour but d'évaluer le risque d'apparition de complications liées aux pathologies à CMVH. Cette recherche est effectuée à travers différents prélèvements en fonction du contexte clinique (sang, sécrétions pharyngées, urine, LCS, biopsies, liquide amniotique, tissus fœtaux). Le diagnostic de l'infection à CMVH peut être réalisé à l'aide de différentes techniques dites indirectes ou directes.

Techniques indirectes :

L'infection à CMVH peut être détectée indirectement par une sérologie. Les techniques quotidiennes sont de type immunoenzymatiques (EIA « *enzyme immuno-assay* » ou ELISA « *Enzyme-linked immunosorbent assay* ») et permettent la détection des anticorps totaux ou de différencier les isotypes IgG et IgM. Le statut sérologique est déterminé par les IgG. Les IgM sont présentes lors des primo-infections mais aussi dans la moitié des réinfections ou réactivations et donc d'interprétation difficile. Dans ce cas une mesure de l'avidité des IgG peut permettre d'identifier une primo-infection.

Techniques directes :

Néanmoins, la recherche directe du CMVH est à privilégier à la fois pour le diagnostic des complications au niveau d'un ou plusieurs organes, et pour la surveillance de la virémie chez les patients immunodéprimés.

L'examen cytologique effectué à partir de frottis, d'un étalement de liquides biologiques sur lames ou de coupes de tissus, révèle des inclusions intranucléaires et intracytoplasmiques en « *œil de hibou* » caractéristiques de l'effet cytopathique de l'infection à CMVH. Cette technique est réalisée dans des laboratoires de pathologie, en particulier lors de colites ou sur les biopsies des organes greffés.

Les cellules de choix pour l'inoculation des prélèvements sont les fibroblastes humains embryonnaires (MRC-5). Un délai de 8 à 20 jours est nécessaire pour observer les premiers

foyers d'effet cytopathique (ECP) classiquement décrit en « *banc de poissons* » mais parfois il peut s'étendre jusqu'à six semaines. La culture cellulaire classique reste la seule technique permettant de conserver et de caractériser les souches virales. Pour le diagnostic, la culture rapide repose sur l'association de la centrifugation de l'inoculum sur les fibroblastes et la détection des antigènes très précoces par immunocytochimie, après 24 à 48 heures d'incubation. Elle est progressivement abandonnée au profit de la mesure du génome viral en particulier pour la surveillance de la virémie chez les immunodéprimés.

La détection des acides nucléiques viraux (ADN ou ARN) est réalisée grâce à différentes techniques d'amplification par réaction de polymérisation en chaîne (PCR). Le diagnostic de l'infection par biologie moléculaire se fait essentiellement par PCR en temps réel permettant ainsi de mesurer la charge virale. De nombreuses trousse de biologie moléculaire ont été mises au point pour améliorer la mise en œuvre et la standardisation du diagnostic avec des résultats en unités internationales (UI), permettant ainsi de comparer les résultats entre laboratoires.

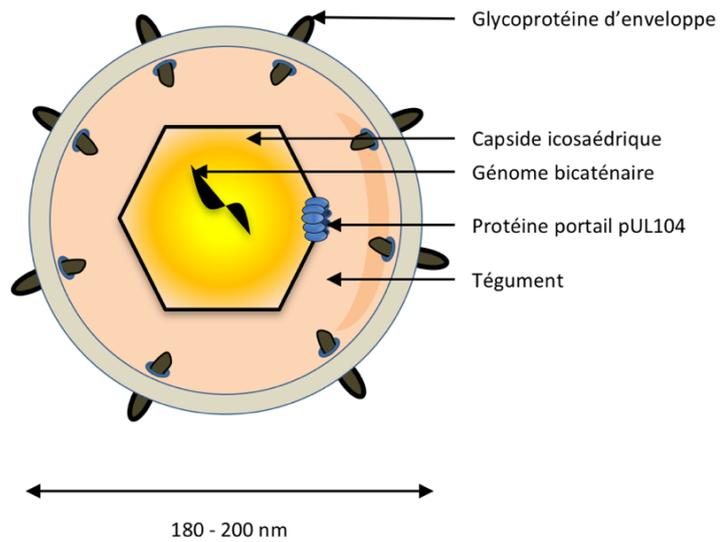


Figure 3 : Structure du CMVH. La particule virale du CMVH, d'une taille comprise entre 100 et 200 nm de diamètre, porte à sa surface des glycoprotéines d'enveloppe, possède un tégument et une capsid icosaédrique renfermant le génome linéaire bicaténaire de 230 kb.

GENERALITES SUR LE CYTOMEGALOVIRUS HUMAIN

STRUCTURE DU VIRUS ET DU GENOME

Le virion est une particule enveloppée de 180 à 200 nm de diamètre constituée d'une capsidie icosaédrique, qui possède 162 capsomères, d'environ 100 nm de diamètre renfermant un génome bicaténaire (**Figure 3**).

L'enveloppe est constituée d'une bicouche lipidique dérivée des membranes internes cytoplasmiques de la cellule infectée. L'enveloppe comporte des glycoprotéines, dont les plus étudiées sont les glycoprotéines B, H, M/N et L (respectivement gB, gH, gM/N et gL). Les glycoprotéines gB et gH sont notamment impliquées dans la fixation spécifique du CMVH aux récepteurs cellulaires. Les glycoprotéines forment différents complexes qui sont responsables de l'entrée du virion dans la cellule ou encore de l'infection cellules à cellules.

Le tégument (ou matrice) qui sépare la capsidie virale de la membrane est composé de phosphoprotéines, notamment des protéines pp150 ou ppUL32 et pp65 ou ppUL83.

La capsidie du CMVH est composée de sept protéines. On retrouve la protéine pUL86, aussi nommée protéine majeure de capsidie, MCP (« *Major Capsid Protein* »), participant à la formation des pentamères et hexamères qui se retrouve à la base de la structure icosaédrique. La protéine pUL85, ou protéine mineure de capsidie, mCP (« *minor Capsid Protein* »). Située à l'intérieur de la capsidie, pUL85 permet l'ancrage de l'ADN à la capsidie. La protéine pUL46 ou protéine mineure de fixation, mC-BP (« *minor capsid-Binding Protein* ») assure le maintien des pentamères et hexamères. La petite protéine de capsidie, SCP (« *Smallest Capsid Protein* ») pUL48/49 et trois protéines dérivant du peptide pUL80.

Le génome du CMVH, un ADN linéaire bicaténaire de 230 kb, est le plus long et le plus complexe parmi les herpes virus. Ce génome viral, qui a complètement été séquencé, code environ 180 protéines virales dont 35 protéines constitutives de la particule virale (virion), les autres protéines intervenant dans la réplication du CMVH et dans les interactions avec le métabolisme cellulaire.

Le génome du CMVH comprend deux segments uniques, un « *segment unique long* » correspondant à 82% du génome qui contient 132 cadres ouverts de lecture (*UL1* à *UL132*) et un « *segment unique court* » comportant 24 cadres ouverts de lecture (*US1* à *US34*). Ces deux segments uniques sont tous deux flanqués par des séquences inversées répétées (LTR « *Long Terminal Repeat* » / LIR « *Long Internal Repeat* » et STR « *Short Terminal Repeat* » / SIR « *Short Internal Repeat* »). Le génome du CMVH comporte, aux extrémités et entre les séquences LIR et SIR, des séquences répétées appelées séquences « *a* » qui contiennent des éléments cis régulateurs nommés « *pac* » ou « *cis-acting packaging element* ». Ces séquences régulatrices sont impliquées dans le mécanisme d'encapsidation du génome viral en intervenant dans le clivage des concatémères d'ADN produits lors de la réplication virale (Bogner et al., 1998) (Figure 4).

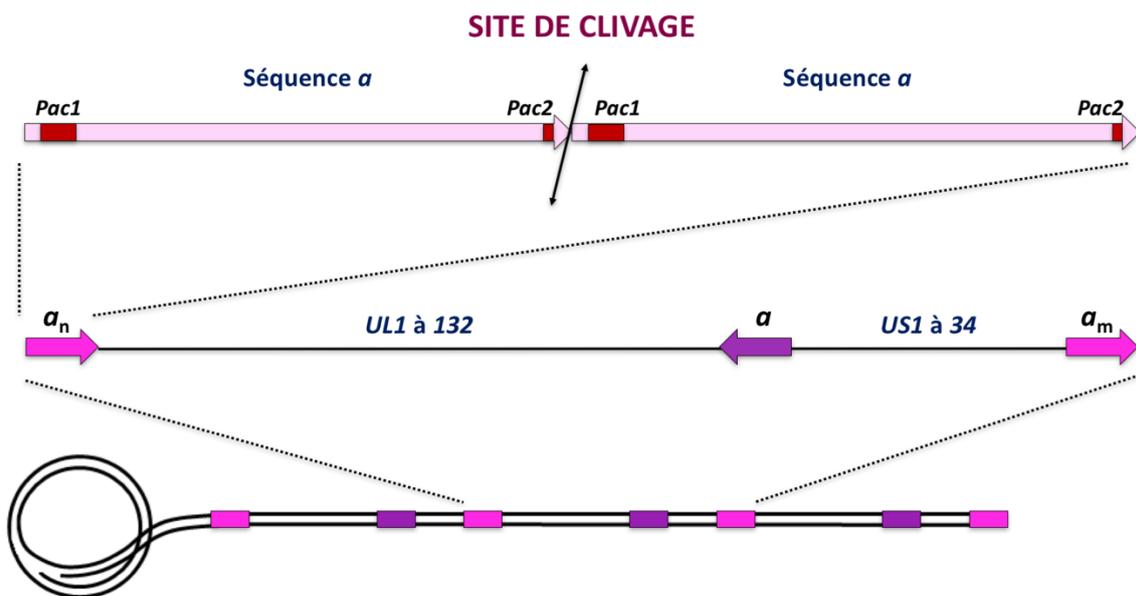


Figure 4 : Du génome complet au site de clivage. Adapté de Ligat et al., under review. Le génome du CMVH, un ADN linéaire bicaténaire de 230 kb, comprend deux segments uniques, le « *segment unique long* » et le « *segment unique court* ». Ces deux segments sont tous deux flanqués par des séquences inversées répétées (TRL/IRL et TRS/IRS). Le génome du CMVH comporte, aux extrémités et entre les séquences IRL et IRS, des séquences répétées appelées séquences « *a* » qui contiennent des éléments cis régulateur nommés « *pac* ou *cis-acting packaging element* ». UL : « *Unique Long* » ; US : « *Unique Short* » ; TRL : « *Terminal Repeat long* » ; TRS : « *Terminal Repeat short* » ; IRL : « *Internal Repeat long* » ; IRS : « *Internal Repeat Short* ».

L'expression des gènes du CMVH est régulée et coordonnée en cascade. Ses gènes sont classés en trois groupes en fonction de la phase du cycle de réplication lors de laquelle ils sont exprimés.

Les gènes très précoces, « *Immediate Early* » (IE) ou α codent des protéines intervenant dans l'activation et la répression des gènes viraux et cellulaires permettant la régulation du cycle cellulaire. Les gènes précoces, « *Early* » (E) ou β codent des protéines impliquées dans la réplication virale. On retrouve notamment la polymérase virale pUL54, la protéine accessoire pUL44, les sous-unités du complexe hélicase-primase, pUL70, pUL102, pUL105 et la kinase virale pUL97. Les gènes tardifs, « *Late* » (L) ou γ codent les protéines de l'enveloppe, du tégument et de la capsid (Landolfo et al., 2003) (Figure 5).

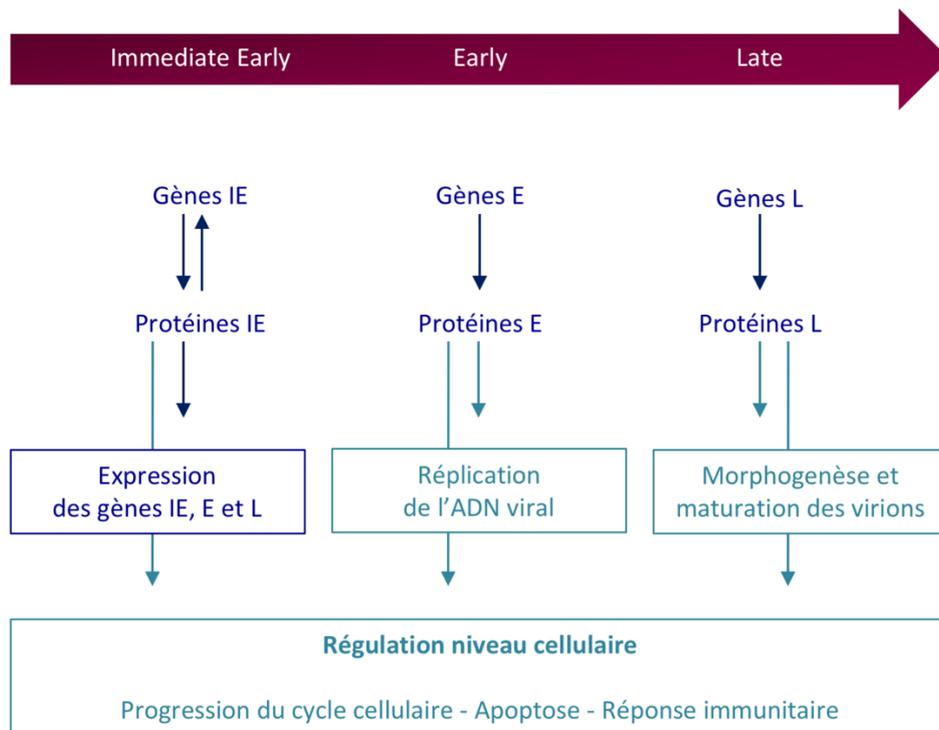


Figure 5 : Expression et fonctions des gènes viraux lors du cycle de réplication viral. Adaptée de Landolfo et al., 2003. Au cours du cycle viral, le génome du CMVH est exprimé dans une cascade régulée et coordonnée temporellement conduisant à la synthèse de trois catégories de protéines virales décrites 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.

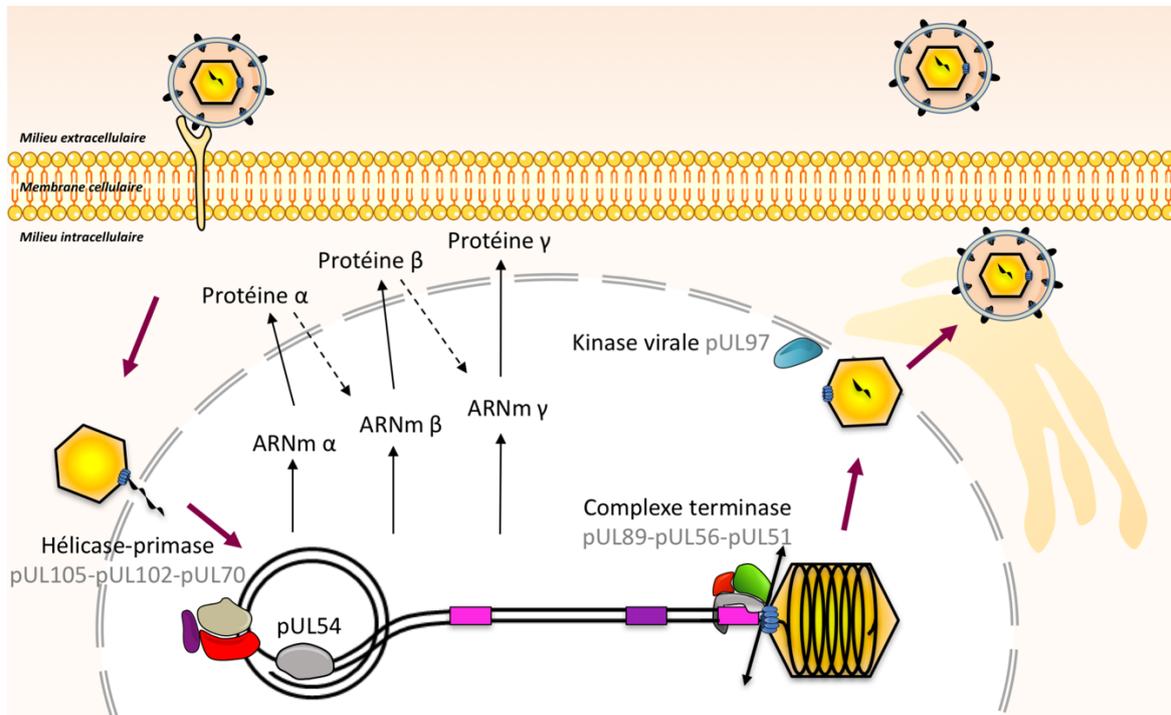


Figure 6 : Cycle de réplication du CMVH. Après l'attachement, la fusion des membranes cellulaires et virales aboutit à la pénétration du virus qui est transporté via le réseau des microtubules jusqu'au noyau où l'ADN viral est libéré et circularisé. La réplication, selon le modèle du cercle roulant, 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 néo virion ainsi formé nécessite la kinase virale pUL97. Le virion est transporté dans le cytoplasme via le réseau des microtubules permettant sa maturation et son enveloppement dans l'appareil de Golgi avant son excrétion.

MECANISME DE REPLICATION

Le CMVH ne se réplique que dans des cellules humaines. *In vitro*, les cellules de choix pour l'isolement viral sont les fibroblastes humains embryonnaires. La durée du cycle de réplication, étudiée dans les fibroblastes humains en culture, est de 96 à 120 heures (**Figure 6**).

L'infection virale débute par une phase de liaison du virus à la cellule cible. Les récepteurs permettant l'interaction et l'attachement sont, à ce jour, mal connus. Néanmoins, les récepteurs pour les intégrines $\beta 1$ et $\beta 2$ agissent comme des corécepteurs d'entrée pour le CMV (**Feire et al., 2004**). Les intégrines sont connues pour fonctionner de manière synergique avec des récepteurs de facteurs de croissance (EGFR). Suite à l'interaction avec le récepteur, l'entrée du virus se fait par fusion des membranes cellulaires et virales (**Kinzler and Compton, 2005**). La nucléocapside virale est ensuite transportée via le réseau des microtubules jusqu'au noyau cellulaire où l'ADN viral est délivré (**Figure 6**) (**Figure 7**).

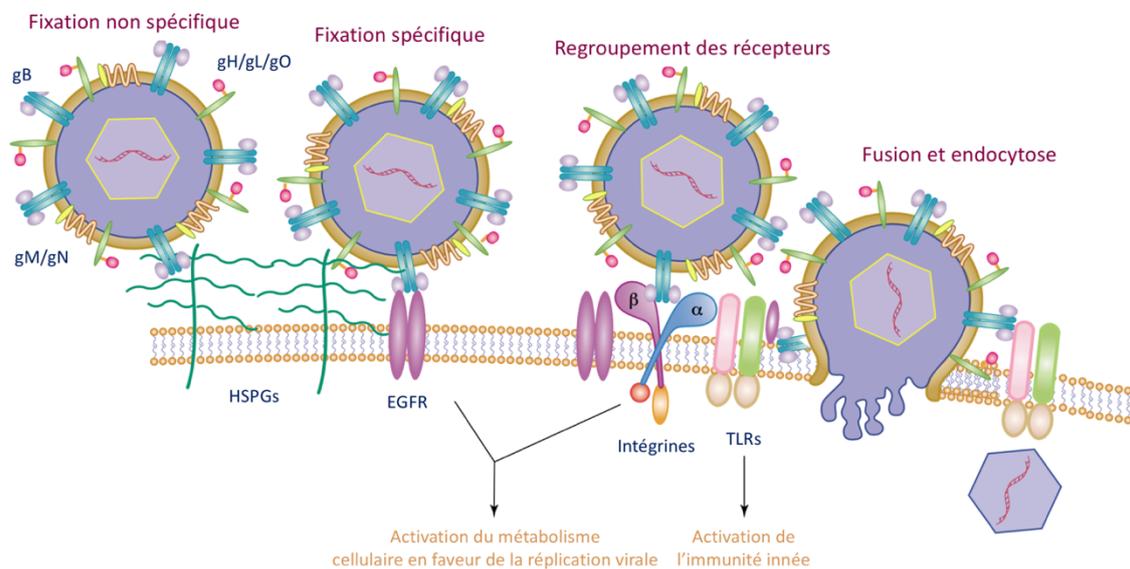


Figure 7 : Mécanisme d'entrée du CMVH. Adapté de Compton, 2004. L'entrée du virus dans la cellule peut se faire par fixation non spécifique des éléments de la matrice extracellulaire, fixation spécifique des glycoprotéines d'enveloppe permettant l'activation de cascades cellulaires (MAPK, NF- κ B). La fixation des glycoprotéines permet un rapprochement de certains récepteurs (EGFR, intégrines) aboutissant au rapprochement du CMVH avec la membrane permettant leur fusion et l'entrée de la capsid et des protéines du tégment dans la cellule par endocytose puis translocation vers le noyau.

A l'instar de l'expression des gènes détaillée précédemment, la réplication du CMVH se décompose, comme pour les autres *Herpesviridae*, en trois phases : la phase très précoce, « *Immediate Early* » (IE) où se déroule la synthèse de protéines activatrices, la phase précoce, « *Early* » (E) où se déroule la synthèse de protéines enzymatiques et la phase tardive, « *Late* » (L) où se déroule la synthèse des composants de la capside et des glycoprotéines.

Le mécanisme de réplication du CMVH, en « cercle roulant », est notamment catalysé par l'expression du complexe hélicase-primase, pUL70, pUL102, pUL105 et de la polymérase virale pUL54 (**Figure 6**). Cette protéine précoce de 1242 résidus, 140 kDa, est codée par un gène de 3729 pb localisé dans la région unique longue. La polymérase du CMVH présente de fortes homologies avec les polymérases des herpès virus mais aussi avec la polymérase humaine. A ce jour, aucune structure cristallographique n'a été obtenue pour la polymérase du CMVH. La structure obtenue la plus proche de pUL54 est l'ADN polymérase de l'HSV-1 (**Liu et al., 2006**). Néanmoins, la conservation des séquences protéiques a permis de mettre en évidence huit domaines conservés. Trois régions fonctionnelles caractérisent la polymérase pUL54 du CMVH, la région 3'-5' exonucléasique (N-terminale), la région portant l'activité polymérasique (partie centrale de la protéine) et la région d'interaction avec la protéine accessoire pUL44 (C-terminale) (**Kouzarides et al., 1987**) (**Larder et al., 1987**) (**Figure 17**). L'activité exonucléasique qui permet de catalyser une fonction de réparation fait intervenir trois domaines conservés (Exo I, Exo II, Exo III) (**Figure 17**). On retrouve deux résidus conservés, parmi les polymérases à activité 3'-5' exonucléasique, au sein du domaine Exo I : alors que, le glutamate 385 (pour le CMVH) participe à la chélation des ions métalliques Mg^{2+} , Zn^{2+} et Mn^{2+} , la leucine 389 (pour le CMVH) intervient dans l'interaction avec les bases azotées de l'extrémité 3' du brin d'ADN néoformé (**Bernad et al., 1989**). Le domaine Exo II contient des résidus conservés impliqués dans l'activité nucléasique : l'asparagine 408, la phénylalanine 412 et l'aspartate 413 (pour le CMVH) impliqués dans la chélation des ions métalliques Mg^{2+} , Zn^{2+} et Mn^{2+} . On retrouve dans le domaine Exo III une tyrosine et un aspartate (Y538 et D542 pour le CMVH) (**Freemont et al., 1988**) (**Derbyshire et al., 1988**). La région portant l'activité polymérasique de pUL54 est la plus conservée et comprend les domaines I, II, III, IV, V, VI et VII (**Figure 17**). Les domaines I, III et VII seraient impliqués dans la liaison des nucléotides triphosphates (**Ye and Huang, 1993**). Le domaine II, riche en acides aminés basiques, pourrait participer à la liaison à l'ADN. Les résidus aspartate et glutamate pourraient intervenir dans la

chélation des ions métalliques Mg^{2+} , Zn^{2+} et Mn^{2+} impliqués dans l'hydrolyse de la fonction phosphodiester des désoxynucléotides triphosphates. La présence d'une protéine accessoire (pUL44 pour le CMVH) permet notamment d'augmenter la processivité d'une polymérase en stabilisant le complexe polymérase/acide nucléique. En 2006, une analyse structurale a montré que l'isoleucine de pUL44 et les résidus de l'extrémité C-terminale de pUL54 étaient nécessaires à l'interaction entre les deux protéines (**Appleton et al., 2006**). Bien qu'aucun cristal de la protéine entière n'ait à ce jour été réalisé, une modélisation par homologie avec la polymérase de l'HSV-1 (PDB 2GV9) nous a permis d'obtenir une structure théorique de la polymérase virale pUL54 (**Hantz et al., 2013**) (**Andouard et al., 2016**) (**Figure 8**).

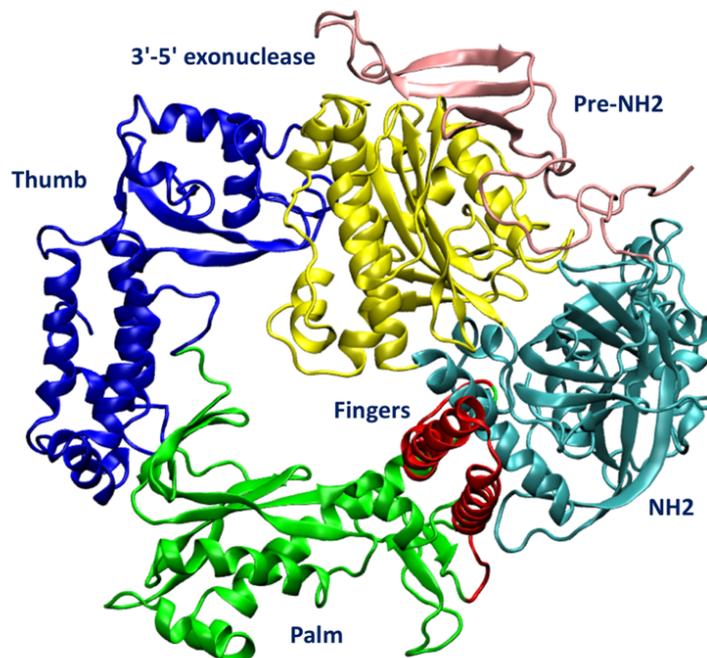


Figure 8 : Structure théorique de la polymérase virale pUL54 représentée en mode « cartoon » (**Hantz et al., 2013**) (**Andouard et al., 2016**). Les différents domaines ont été colorés par homologie avec la polymérase de l'HSV-1 (**Liu et al., 2006**) : Domaine « Pre-NH2 » en rose (résidus 99-295), domaine « NH2 » en bleu clair (résidus 550-600), domaine « 3'-5' exonucléase » en jaune (résidus 296-554), domaine « Palm » en vert (résidus 678-765, 815-877 et 887- 982), domaine « Fingers » en rouge (résidus 766-824), domaine « Thumb » en bleu (résidus 982-1112 et 1154-1222).

La réplication du génome du CMVH aboutit à la formation de concatémères d'ADN qui agissent en tant que substrat lors du processus d'encapsidation (**Figure 6**). Un complexe de protéines virales appelé complexe terminase permet la reconnaissance, le clivage et la translocation des unités de génome dans des capsides néoformées (**McVoy and Adler, 1994**). Le processus d'encapsidation implique un clivage site-spécifique au niveau de séquences riches en AT dans des motifs « *pac* » (« *cis-acting packaging signal* ») situés au sein des séquences « *a* ». L'encapsidation débute lorsque le motif « *pac* » est reconnu par le complexe terminase. Ce complexe hétéro-oligomérique est notamment composé des sous-unités pUL56, pUL89 et pUL51 (**Scheffczik et al., 2002**) (**Borst et al., 2013**). Plusieurs protéines ont récemment été identifiées comme pUL52, pUL77 et pUL93 (**Borst et al., 2008**) (**Borst et al., 2016**) (**DeRussy and Tandon, 2015**) (**DeRussy et al., 2016**). Après translocation du complexe terminase dans le noyau, celui-ci reconnaît les séquences « *pac* », effectue un premier clivage et recrute une capside vide. Le complexe terminase réalise alors un second clivage de l'ADN qui est libéré dans la capside via une interaction avec les protéines pUL104 puis le complexe se dissocie pour permettre une nouvelle encapsidation (**Bogner, 2002**) (**Figure 9**).

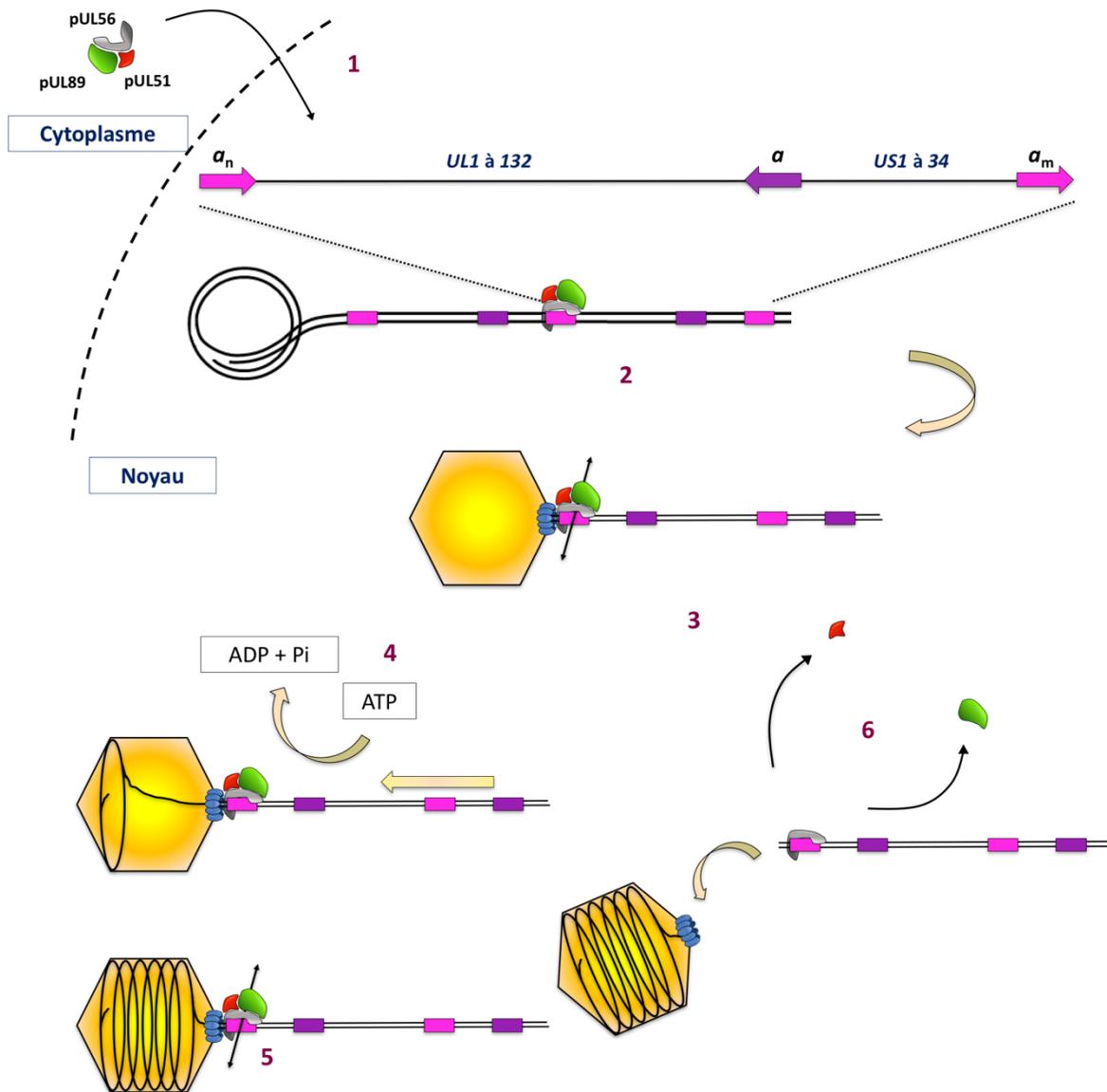


Figure 9 : Mécanisme d'encapsidation et complexe terminase. Adapté de Ligat et al., under review.
 1) Translocation du complexe terminase dans le noyau 2) Le complexe terminase se lie spécifiquement au site « *pac* » et recrute une pro-capside, 3) clivage de l'ADN bicaténaire, 4) exerce son activité ATPasique pour transférer une unité de génome dans la capside et 5) complète le processus d'encapsidation en coupant l'excès d'ADN. 6) Enfin, le complexe ADN-terminases se dissocie de la capside et est prêt pour l'étape d'encapsidation suivante.

Ce processus aboutit à la libération de trois types de capsides : les capsides vides ou capsides A, les corps denses (agrégats de protéines du tégument enveloppées) ou capsides B et les capsides contenant l'ADN viral ou capside C qui sont considérées comme les précurseurs des particules infectieuses (**Tandon et al., 2015**) (**Figure 10**).

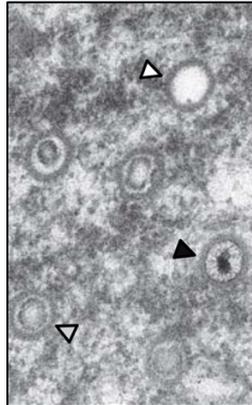
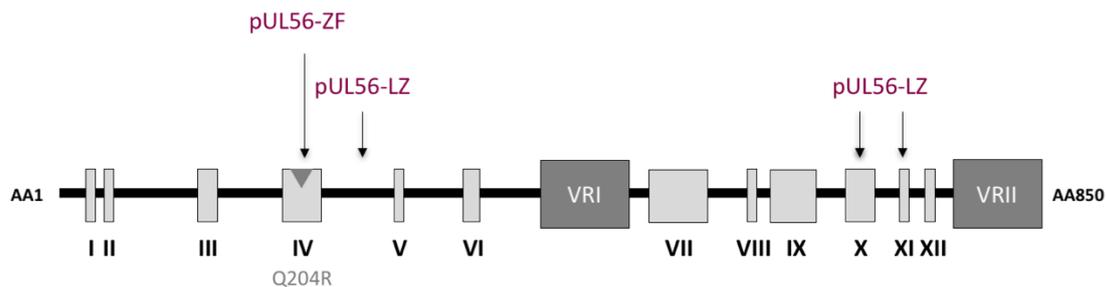


Figure 10 : Différents types de capsides observés en microscopie électronique (Borst et al., 2016). Les cellules RPE-1 (Retinal Pigmented Epithelial) ont été transfectées par adénofection et examinées par microscopie électronique afin d'observer les différents types de capsides dans le noyau. Flèche blanche : capside A, flèche grise : capside B, flèche noire : capside C.

La protéine d'encapsidation pUL56 est une protéine hautement conservée capable de se dimériser (**Savva et al., 2004**). pUL56, aussi nommée grande sous-unité du complexe terminase, est une protéine de 850 acides aminés codée par un gène de 2553 pb situé dans le segment unique long du génome du CMVH. Cette protéine, composée de douze domaines conservés (I-XII) (**Champier et al., 2008**), comporte en C-terminal une région NLS (signal de localisation nucléaire) qui permet l'interaction avec l'importine cellulaire et par conséquent le passage de cette protéine au niveau intranucléaire. Deux acides aminés, R et K respectivement aux positions 822 et 823, sont nécessaires à la localisation intranucléaire de pUL56 (**Giesen et al., 2000**). Par ailleurs, cette protéine possède dans sa partie C-terminale un potentiel motif « *leucine zipper* » (situé entre les leucines 726 et 758) (**Bogner, 2002**). La partie N-terminale semble jouer un rôle fondamental dans l'encapsidation. En effet, plusieurs études suggèrent que pUL56 porte une activité endonucléase. Bogner et ses collaborateurs ont montré une interaction site-spécifique de pUL56 au niveau des séquences « *pac* » (**Bogner et al., 1998**). De façon intéressante, en position N-terminale de pUL56, entre les résidus 90 et 219, on

retrouve un hypothétique motif en doigt de zinc. Ces structures sont connues comme étant des domaines protéiques impliqués dans des interactions protéines / acides nucléiques et notamment protéines / ADN. Par ailleurs, une étude de 2001 a montré que pUL56 portait, *in vitro*, une activité ATPasique (**Hwang and Bogner, 2002**). Enfin, par coimmunoprécipitation, Hwang et bogner ont détecté une interaction entre la partie C-terminale de pUL56 et pUL89 (**Hwang and Bogner, 2002**) (**Figure 11**).



Régions conservées de pUL56 :

I - M21-P31	IV - C191-I220	VII - E514-R572	X - Y676-F713
II - F41-Q62	V - Q272-W300	VIII - Y590-L600	XI - V732-F744
III - L134-E141	VI - E356-I374	IX - I617-L658	XII - D755-L764

Régions variables de pUL56 :

VRI - A425-E485 VRII - V778-R850

Figure 11 : Régions conservées de la sous-unité pUL56 du complexe terminase. Adapté de Ligat et al., under review. La protéine pUL56 est composée de douze domaines conservés (I - XII). La région conservée IV représente l'hypothétique domaine doigt de zinc. La région centrale et le domaine C-terminale comporte deux régions variables annotées VRI et VRII. Trois hypothétiques « *leucine zipper* » annotés pUL56-LZ sont indiqués.

La petite sous-unité du complexe terminase du CMVH, la protéine pUL89, est une protéine de 674 acides aminés codée par un gène de 2025 pb situé dans le segment unique long du génome du CMVH. Différents motifs conservés ont été mis en évidence *in silico*. On retrouve notamment un motif de fixation de l'ATP ($_{156}\text{EPFQ}_{159}$), un motif de type « *Walker A* » ou motif I ($_{213}\text{PRRHGKT}_{219}$), un motif de type « *Walker B* » ou motif II ($_{305}\text{LLLVD EAHFI}_{314}$), et le

motif III (₃₃₇SST₃₃₉) (**Champier et al., 2007**). Jusqu'à ce jour, 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 (**Hwang and Bogner, 2002**). Les résultats de Thoma et al. suggèrent que la séquence de vingt acides aminés ₅₈₀GRDKALAVEQFISRFNSGYIK₆₀₀ en C-terminale de pUL89 est suffisante pour l'interaction avec pUL56 (**Thoma et al., 2006**). Ce court domaine a par la suite été étudié *in silico* et sa structure a été résolue sous forme d'une hélice alpha exposée (**Couvreux et al., 2010**). La structure cristalline obtenue pour la région C-terminale de pUL89 a aussi permis d'identifier trois résidus conservés (Lys583, Ala586 et Asn595), représentant probablement le domaine d'interaction entre pUL89 et pUL56 (**Nadal et al., 2010**). L'interaction entre les deux sous-unités, pUL56 et pUL89 a probablement lieu dans le cytoplasme, puis ces protéines sont transloquées vers le noyau. Deux NLS putatifs ont été proposés pour catalyser la localisation intra-nucléaire de la sous-unité pUL89, bien qu'aucune preuve expérimentale n'ait été à ce jour obtenue pour soutenir cette hypothèse (**Champier et al., 2007**). Néanmoins, une étude de 2012 indique que la sous-unité pUL89 ne se translate vers le noyau qu'avec son partenaire pUL56 (**Wang et al., 2012**) (**Figure 12**).

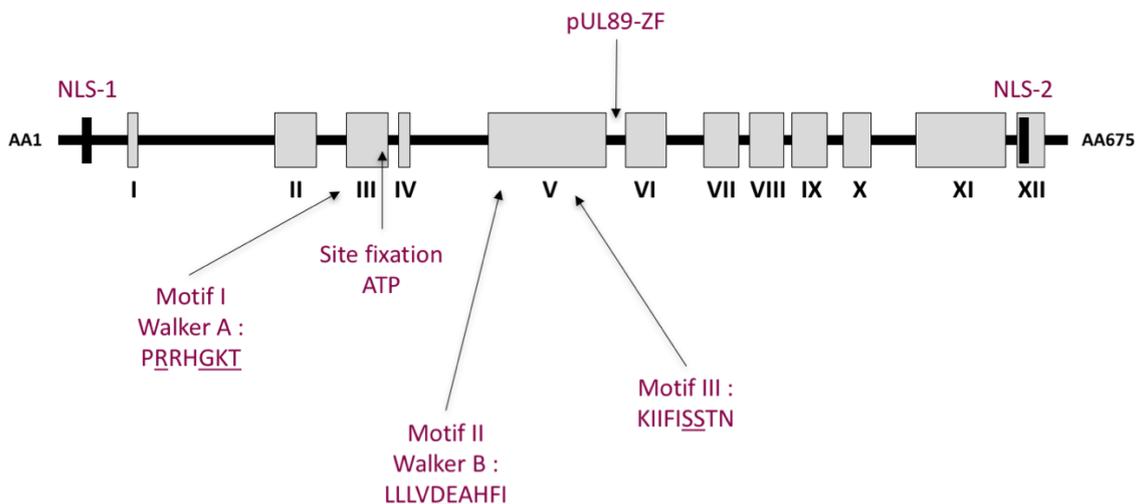


Figure 12 : Régions conservées de la sous-unité pUL89 du complexe terminase. Adapté de Ligat et al., under review. La protéine pUL89 est composée de douze domaines conservés (I - XII). Elle comporte plusieurs hypothétiques domaines fonctionnels. On retrouve deux NLS (signal de localisation nucléaire) annotés NLS-1 et NLS-2, un doigt de zinc annoté pUL89-ZF, un site de fixation de l'ATP. Les résidus probablement impliqués dans l'activité des différents domaines sont soulignés.

La protéine pUL51, composée de 157 acides aminés et codée par un gène de 474 pb situé dans le segment unique long, a été récemment identifiée comme étant un partenaire de pUL56 et pUL89, nécessaire au clivage **(Borst et al., 2013) (Neuber et al., 2017)**.

L'exportation extranucléaire de la capsid est réalisée via la phosphotransférase pUL97 et sa protéine accessoire pUL27 **(Krosky et al., 2003a) (Figure 6)**. pUL97 fait partie de la famille des protéines sérine/thréonine kinases, capable de transférer le groupement phosphate γ d'une molécule d'ATP sur le groupement hydroxyle d'une thréonine ou d'une sérine. Il existe de nombreux substrats, d'origine virale ou cellulaire. Par ailleurs, la kinase virale pUL97 est capable de s'autophosphoryler sur les résidus sérines 2, 3, 11, 13, 133 et les résidus thréonines 16, 18, 134 et 177 **(Baek et al., 2002)**. Cette kinase participe à la synthèse d'ADN par une interaction et la phosphorylation de la protéine accessoire pUL44. La région de pUL97 impliquée dans l'interaction avec pUL44 se situe entre les résidus 366 et 459 **(Krosky et al., 2003b) (Marschall et al., 2003)**. pUL97 est une protéine de 707 acides aminés, hautement conservée au sein des herpes virus **(Hanks et al., 1988) (Chee et al., 1989) (Smith and Smith, 1989)**, codée par un gène de 2124 pb présent dans le segment unique long. Un domaine de régulation et un signal de localisation nucléaire (entre les résidus 48 et 100) ont été mis en évidence dans le segment N-terminal et un domaine catalytique dans le segment C-terminal **(Michel et al., 1998)**. Par homologie de séquences protéiques de protéines kinases, onze domaines ont été identifiés (I à XI) au sein de pUL97 et des homologues de l'HHV-6, de l'HSV, de l'EBV et du VZV **(Hanks et al., 1988) (Chee et al., 1989) (Smith and Smith, 1989)**. Le domaine I contient une séquence consensus GXGXXG (₃₃₈GQGSFG₃₄₃ pour le CMVH) hautement conservée constituant un site de liaison aux nucléotides et notamment à l'ATP. En plus de fournir l'énergie, l'hydrolyse de l'ATP permet d'obtenir le phosphate nécessaire à la phosphorylation catalysée par cette kinase. En 1999, Michel et ses collaborateurs ont montré le caractère essentiel de différents acides aminés (G240, A442, L446 et F523) dans l'autophosphorylation de pUL97 **(Michel et al., 1999)**. Le domaine II présente une lysine catalytique conservée (lysine 355 pour le CMVH) qui joue un rôle fondamental dans l'activité kinase. En effet, sa délétion ou sa substitution aboutit à une perte d'activité kinase de pUL97 **(He et al., 1997)**. A ce jour, aucun rôle n'a été attribué aux domaines III, IV et V. Le domaine VI est segmenté en deux sous-domaines, VIA et VIB. Alors que le sous-domaine VIA contient un résidu histidine conservé (H448 pour le CMVH) de rôle inconnu, le sous-domaine VIB

comporte deux résidus conservés (D456 et N471 pour le CMVH) qui interagissent avec l'ATP et plus particulièrement avec le γ -phosphate et le Mg^{2+} (Hanks et al., 1988). Le domaine VII contient un motif consensus DXx où « X » est un résidu dont la chaîne latérale comporte un cycle et « x » est un résidu neutre (₄₈₁DYS₄₈₃ pour le CMVH). Le domaine VIII comprend un motif APE qui n'est pas retrouvé dans la séquence de pUL97. Le domaine IX présente une séquence consensus DXXXXG de fonction inconnue à ce jour (₅₇₄DEV₅₈₀ pour le CMVH). Les domaines X et XI sont moins conservés que les autres domaines et leur fonction n'est pas élucidée. Bien que cette kinase ne soit pas cristallisée, des modélisations par homologie se basant sur la structure de la kinase cellulaire Cdk2 (PDB 1VYW) (Pevarello et al., 2004) (Romaker et al., 2006) ont été réalisées.

Le transport dans le cytoplasme est pris en charge par le réseau des microtubules afin de permettre la maturation du virion et son enveloppement au niveau de l'appareil de Golgi avant son excrétion hors de la cellule hôte (Figure 6).

Un chapitre intitulé « Exploration du complexe hélicase-primase » sera consacré aux composants du complexe hélicase-primase. De la même façon, le processus d'encapsidation de l'ADN viral sera développé dans le chapitre « Exploration du complexe terminase ».

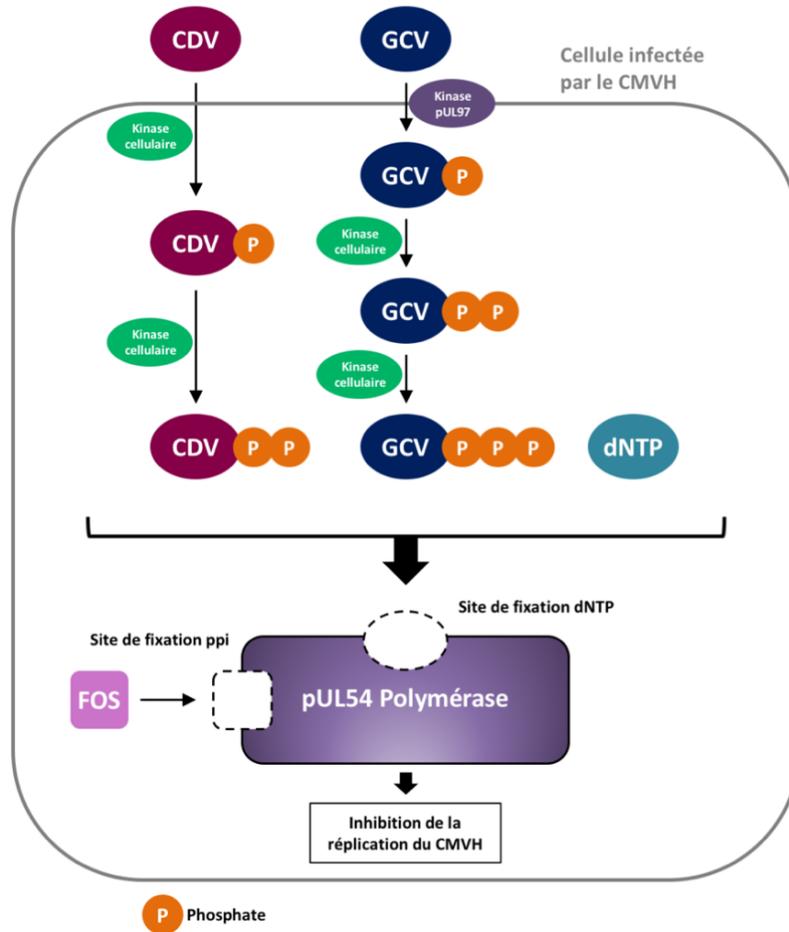


Figure 13 : Mécanisme d'action des principales molécules anti-CMV. Adapté de Chaer et al., 2016. Dans les cellules infectées par le CMVH, le ganciclovir (GCV) et le valganciclovir (VGCV) doivent subir une première phosphorylation par la kinase virale pUL97 avant d'être phosphorylés deux fois par des kinases cellulaires. La phosphorylation du cidofovir (CDV) est indépendante de la kinase virale pUL97. GCV, VGCV, CDV sont en compétition avec le désoxynucléotide triphosphate pour la fixation à la polymérase virale pUL54. Le foscarnet (FOS) ne nécessite pas d'être phosphorylé afin d'être actif dans la cellule.

TRAITEMENTS ET MECANISMES DE RESISTANCES

La prise en charge thérapeutique des patients reste actuellement très difficile avec peu de traitements disponibles présentant de nombreux effets indésirables et notamment une toxicité rénale ou hématologique. Les antiviraux actuels, tous inhibiteurs de la polymérase virale, entraînent l'émergence de résistances croisées, et sont contre-indiqués pendant la grossesse du fait de leur toxicité.

Les molécules :

Le ganciclovir (GCV) ou 9-(1,3-hydroxy-2-propoxyméthyl) guanine, analogue acyclique de la désoxyguanosine, utilisé depuis les années 1980 est la molécule la plus administrée en pratique clinique. Le GCV doit, pour être actif, subir trois étapes de phosphorylations. La primo-phosphorylation dépend de la sérine/thréonine kinase virale pUL97 tandis que les deux autres dépendent de kinases cellulaires. Cette molécule fut la première à être proposée pour le traitement des infections à CMVH et reste à ce jour la plus couramment utilisée. Le GCV agit au niveau du site catalytique de l'ADN polymérase par compétition avec la désoxyguanosine et bloque ainsi l'élongation de l'ADN. *In vitro*, la concentration inhibitrice 50% (CI50) est comprise entre 2,5 µM et 8 µM. Le GCV fut le premier agent antiviral homologué pour le traitement de l'infection à CMVH et reste la molécule de choix, en première ligne, pour le traitement de l'infection à CMVH chez les transplantés. De par sa faible biodisponibilité par voie orale, le GCV doit être administré par voie intraveineuse. La voie intraoculaire est une alternative pour les infections oculaires (**Figure 13**) (**Figure 14**). Ainsi, et afin de pallier à la faible biodisponibilité du GCV par voie orale, le valganciclovir (VGCV, valylester du GCV) a été développé). Le GCV par voie intraveineuse est préférentiellement administré dans les formes graves de maladie à CMVH ou en cas de difficulté à adapter la posologie du VGCV à la fonction rénale.

Le cidofovir (CDV) ou (S)-1-(3-hydroxy-2-phosphoryl-méthoxypropyl) cytosine, qui nécessite d'être phosphorylé deux fois par des kinases cellulaires, est aussi un inhibiteur compétitif de pUL54. Le CDV appartient à la famille des analogues nucléotidiques (analogue

de la désoxycytidine). La CI50 obtenue *in vitro* est plus faible que celle obtenue avec le GCV, de 0,5 μM à 1 μM . Le CDV est administré par voie intraveineuse. Le principal effet indésirable est une toxicité rénale (protéinurie et hypercréatinémie) **(Figure 13) (Figure 14)**.

Le foscarnet (FOS) ou trisodium phosphonoformate, un analogue de pyrophosphate inorganique, inhibe de façon réversible pUL54. L'activité de cette molécule ne requiert aucune étape de phosphorylation. Cette molécule est le plus souvent administrée en deuxième intention chez les patients ne répondant plus à un premier traitement ou qui développent une résistance au GCV. La CI50 du FOS est très variable, de 50 à 800 μM . Son activité est synergique de celle du GCV permettant d'utiliser ces deux molécules en association. Le FOS est administré par voie intraveineuse **(Figure 13) (Figure 14)**.

L'aciclovir (ACV) ou sa prodrogue orale le valaciclovir (VACV) peuvent également être prescrits mais uniquement dans le cadre d'une prophylaxie du fait de sa plus faible efficacité sur le CMVH.

En parallèle des molécules interférant avec l'activité de la polymérase virale pUL54, le formivirsen, un oligonucléotide antisens, empêche l'entrée du CMVH dans le cycle répliatif en inhibant la traduction des gènes très précoces, « *Immediate Early* » (IE) du CMVH. Son développement est à ce jour limité aux formes localisées, de par sa faible biodisponibilité.

Des immunosuppresseurs ont également montré une activité anti-CMVH. L'everolimus est un inhibiteur de la protéine mTOR, une sérine/thréonine kinase régulant la prolifération, la mobilité et la survie cellulaire **(Dreyer et al., 2009)**. Une étude a montré que cette molécule inhibe la réplication virale chez les patients transplantés **(Nashan et al., 2012)**. Le léflunomide, un immunosuppresseur anti-inflammatoire, agit au niveau de la morphogénèse des virions en inhibant la phosphorylation des phosphoprotéines de la capsid virale **(Waldman et al., 1999a) (Waldman et al., 1999b) (Sudarsanam et al., 2006)**.

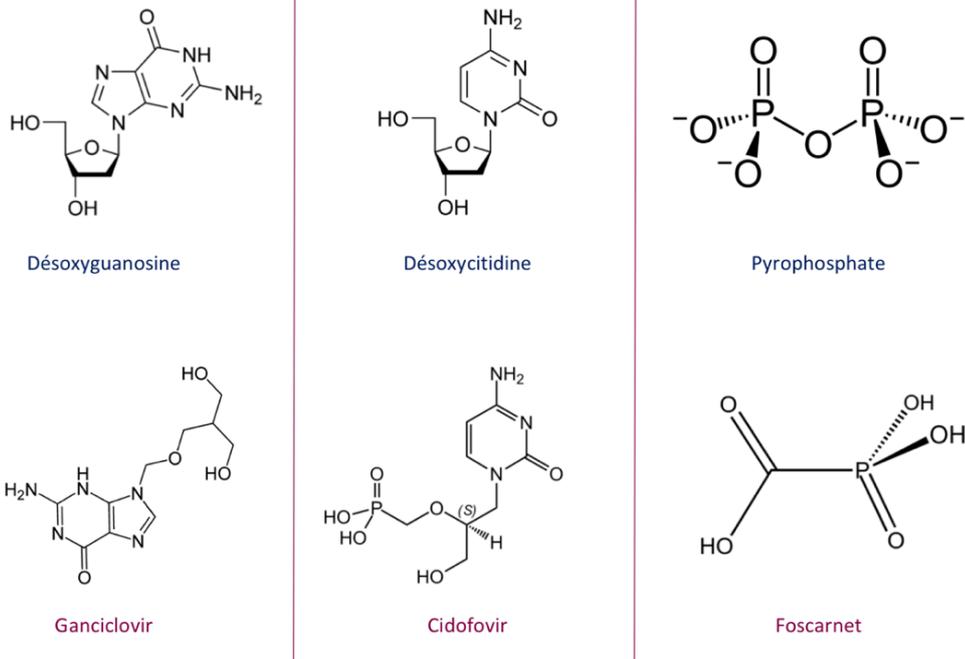


Figure 14 : Structure chimique des principales molécules anti-CMVH utilisées en clinique et de leurs analogues. Le ganciclovir est un analogue de la désoxyguanosine et le cidofovir de la désoxycytidine. Le foscarnet est un analogue de pyrophosphate.

Stratégies thérapeutiques des infections à CMVH :

Traitement de l'infection à CMVH chez les patients immunodéprimés :

En l'absence de traitement préventif, l'infection virale survient dans les trois premiers mois suivant la transplantation. Deux stratégies principales sont couramment utilisées pour la prévention de l'infection à CMVH : la prophylaxie et le traitement préemptif. Néanmoins, le choix de ces stratégies varie entre les différents centres. Le traitement prophylactique repose essentiellement sur l'utilisation du VGCV (à dose prophylactique : 900mg par jour) et vise à prévenir la survenue de l'infection à CMVH chez les receveurs les plus à risques. L'utilisation de VACV à forte dose (2g x 4 par jour) est également possible. L'administration des molécules débute généralement dans la période post-transplantation et peut s'étendre sur une durée de 3 à 6 mois. Le traitement préemptif tend à prévenir l'apparition de manifestations cliniques chez un receveur qui présente une infection à CMVH mise en évidence par une virémie positive à CMVH. Il nécessite donc un suivi régulier de la charge virale (CMVH). Cette option thérapeutique repose sur l'administration de VGCV à dose thérapeutique (900mg x 2 par jour). Enfin, le traitement curatif de l'infection à CMVH dépend des manifestations cliniques (**Kotton et al., 2013**). En première intention, le GCV est administré par voie intraveineuse (5mg/kg x 2 par jour) pendant 2 à 4 semaines associé si possible à une diminution du traitement immunosuppresseur. Un traitement par VGCV est également validé dans cette indication à la dose de 900mg x 2 par jour. Un traitement d'entretien peut être ensuite envisagé par VGCV à demi-dose (900mg par jour) chez les patients à haut risque dans les semaines qui suivent la négativation de la charge virale.

Pour les patients infectés par le VIH, la généralisation des trithérapies anti-rétrovirales, depuis la fin des années 1990, a réduit de 80 % l'incidence des rétinites à CMVH. Au cours de l'infection par le VIH, la prophylaxie n'est pas recommandée de façon systématique chez les patients ayant moins de 50 CD4+. Néanmoins, les patients doivent être alertés sur la nécessité de signaler tout trouble visuel et doivent bénéficier d'examens réguliers du fond d'œil. Les traitements de la rétinite reposent sur l'utilisation par voie générale du GCV, VGCV, CDV ou FOS associés ou non à des injections intravitréennes d'antiviral.

Prise en charge de l'infection materno-fœtale :

L'infection congénitale à CMVH constitue un problème majeur de santé publique. En effet, à ce jour, aucun traitement n'a été validé pour une administration pendant la grossesse. En raison de leur toxicité et de leur potentielle tératogénicité, le GCV, le CDV et le FOS sont contre-indiqués. L'ACV (ou sa prodrogue, le VACV) est la seule molécule que l'on puisse envisager au cours de la grossesse. En effet, l'ACV a été largement utilisée chez la femme enceinte dans les trente dernières années pour le traitement des infections à HSV et les données de pharmacovigilance sont très rassurantes. Cependant, le VACV n'est pas recommandé à ce jour et son utilisation reste limitée à certains centres. Des études sont en cours pour valider son utilisation.

Chez les nouveau-nés infectés lors de la grossesse, les indications de traitement sont restreintes aux atteintes au nouveau-nés sévères, principalement neurologiques. Le VGCV est alors préconisé pour une durée de 6 mois. Aucune indication de traitement n'est envisagée chez les nouveau-nés asymptomatiques (**conférence de consensus Rawlinson, 2017**).

La toxicité des molécules anti-CMVH est une première limite à leur utilisation. En effet, Le GCV et le VGCV sont éliminés par voie rénale. Le principal effet indésirable de ces deux molécules est une toxicité hématologique et peuvent notamment être responsables de neutropénies ou d'anémies. Des troubles rénaux de type hématurie et hypercréatinémie ont aussi été décrits. Le CDV s'accumule dans le cortex rénal et est responsable d'une néphrotoxicité sévère. Cette molécule est réservée en deuxième intention. En effet, cet effet indésirable associé à une faible biodisponibilité limite son utilisation en thérapeutique (**Mercorelli et al., 2008**). De par la forte toxicité rénale, à type de tubulopathie partiellement réversible, le FOS n'est proposé qu'en cas de non réponse au GCV et VGCV. L'ACV présente très peu d'effets indésirables, cette molécule est le plus souvent bien tolérée.

De par leur toxicité et une utilisation prolongée, une seconde limite à l'utilisation de ces différentes molécules est l'émergence de résistances croisées

Mécanismes de la résistance aux antiviraux :

L'utilisation prolongée et répétée des anti-CMVH ciblant la polymérase virale favorise l'émergence de mutations de résistance. L'apparition de souches mutantes résistantes est généralement associée à une aggravation de la symptomatologie clinique et peut conduire à des impasses thérapeutiques. L'émergence de résistances est souvent corrélée à l'évolution des souches sensibles et des souches résistantes. Avant le traitement par un antiviral, les souches sauvages coexistent avec les souches mutantes, générées suite à des erreurs de la polymérase. Le traitement bloque la réplication des souches virales sensibles. Si la pression de sélection est maintenue, les souches virales portant une ou plusieurs mutations de résistance deviennent majoritaires (**Figure 15**).

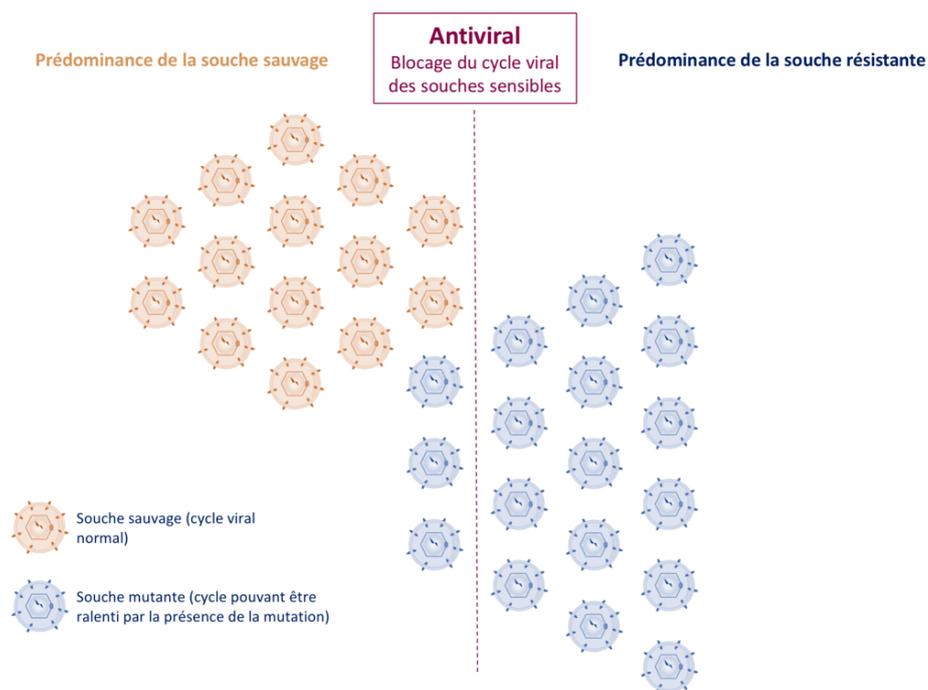


Figure 15 : Cinétique de l'émergence de souches résistantes. Avant le traitement par un antiviral, les souches sauvages et mutantes, générées par des erreurs de la polymérase, coexistent. Le traitement bloque la réplication des souches virales sensibles. Si la pression de sélection est maintenue, les souches virales portant une ou plusieurs mutations de résistance deviennent majoritaires.

La résistance au GCV peut être associée à des mutations de la polymérase pUL54, de la kinase virale pUL97 ou parfois des deux. L'activité du CDV et du FOS est indépendante de pUL97 et n'est donc pas affectée par ces mutations. Les mutations au sein de pUL97 sont généralement les premières à apparaître chez les patients traités par GCV et peuvent se manifester par des mutations ponctuelles ou des courtes délétions pouvant empêcher la phosphorylation du GCV mais n'altérant pas les autres fonctions de pUL97 (**Gilbert and Boivin, 2005a**). Des mutations au sein de pUL97 ont notamment été décrites au sein du domaine IX perturbant la reconnaissance du substrat (**Figure 16**).

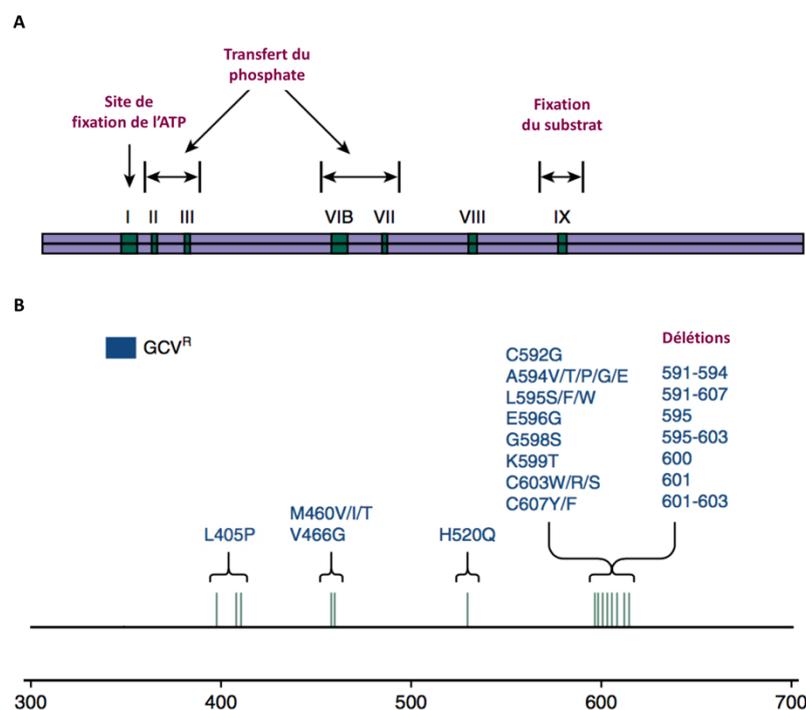


Figure 16 : Carte des mutations de résistance de la kinase virale pUL97. Adapté de Lurain and Chou, 2010 et Chaer et al., 2016. (A) Régions conservées et fonctionnelles de pUL97. (B) Mutations au sein de pUL97 avec le profil de résistance correspondant. Le GCV interagit avec pUL97 au niveau de la région IX, qui correspond à la poche de fixation du substrat.

Les mutations au niveau de la polymérase virale sont moins fréquentes et apparaissent généralement plus tardivement. Les mutations sont retrouvées principalement au sein des domaines conservés (**Figure 17**). De nombreuses mutations conférant une résistance au GCV peuvent entraîner des résistances croisées aux CDV et FOS. (**Lurain and Chou, 2010**) (**Chaer et al., 2016**). Puisque le formivirsen présente une activité indépendante de la phosphorylation par la kinase virale pUL97 et n'interfère pas avec l'activité de la polymérase virale, il reste actif sur les souches résistantes au GCV, CDV et FOS.

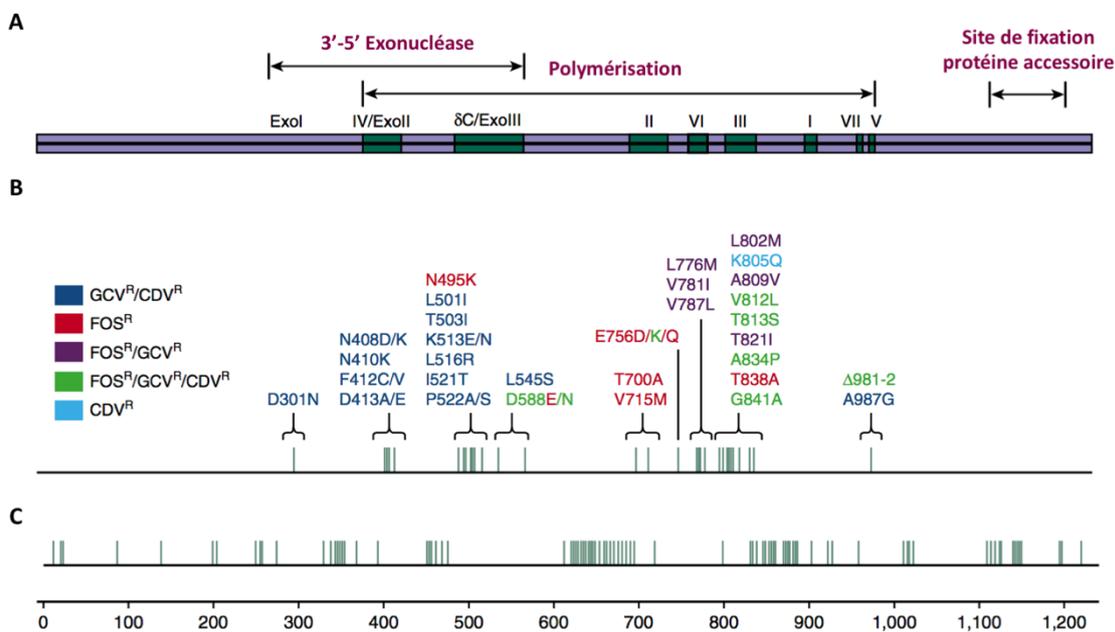


Figure 17 : Carte des mutations de résistance de la polymérase virale pUL54. Adapté de Lurain and Chou, 2010 et Chaer et al., 2016. (A) Régions conservées et fonctionnelles de pUL54. (B) Mutations au sein de pUL54 avec le profil de résistance correspondant. (C) Polymorphismes identifiés au sein de pUL54. La majorité des mutations de la polymérase virale se retrouvent au sein de clusters présents au niveau de régions conservés. Les mutations conférant une résistance au GCV et CDV sont essentiellement présentes dans la région « 3'-5' exonucléase » et dans le domaine V de la région « polymérase ». Les mutations conférant une résistance au FOS sont localisées dans la région Exo III et dans le domaine II et III de la région « polymérase ». Les mutations conférant une résistance aux trois antiviraux (GCV, CDV, FOS) sont présentes au niveau du domaine Exo III et domaine III, VII et V de la région « polymérase ».

Détection de la résistance aux antiviraux :

La détection de la résistance se fait selon une approche phénotypique et génotypique. L'approche phénotypique est basée sur la mesure de la concentration d'un antiviral inhibant 50 à 90% (CI50 et CI90) la réplication virale. On détermine ensuite l'indice de sensibilité à 50% (IS50). L'IS50 correspond ainsi à la CI50 de la souche étudiée, rapporté à la CI50 de la souche de référence, testée au cours du même essai. Une souche virale peut être considérée comme résistante lorsque sa CI50 est au moins 3 fois supérieure à celle de la souche de référence. Le diagnostic génotypique consiste à rechercher les mutations de résistances en analysant les séquences nucléotidiques des gènes viraux *UL97* et *UL54*. Lorsqu'une mutation non décrite dans la littérature est détectée, il est nécessaire de réaliser une étude phénotypique après transfert de la mutation à une souche recombinante afin d'évaluer l'impact de la mutation sur sa sensibilité aux différents anti-CMVH et sur la capacité répliquative de la souche.

Bien que les molécules disponibles pour traiter le CMVH soit efficaces, elles présentent toute une toxicité et une utilisation prolongée et répétée favorise l'émergence de résistances. Par ailleurs, une autre limite est l'absence d'antiviral pour une utilisation dans le traitement de l'infection congénitale à CMVH. De par les nombreuses limites à l'utilisation de ces molécules, il devient essentiel de développer de nouvelles thérapies anti-CMVH.

Tableau I : Molécules en cours de développement.

Molécules	Phase	Target	Manufacturer	Identifiant	First received
Brincidofovir	3	pUL54	Chimerix	NCT02439970	2015
	3	pUL54	Chimerix	NCT02439957	2015
	3	pUL54	Chimerix	NCT01769170	2013
	2	pUL54	Chimerix	NCT00942305	2009
Cyclopropavir	1	pUL54	National Institute of Allergy and Infectious Diseases (NIAID)	NCT02454699	2015
Artesunate	3	Voie NF-κB	Hadassah Medical Organization	NCT00284687	2006
Maribavir	3	pUL97	Shire	NCT02931539	2016
	3	pUL97	Shire	NCT02927067	2016
	1	pUL97	Shire	NCT02775240	2016
	2	pUL97	Shire	NCT01611974	2012
	3	pUL97	Shire	NCT00497796	2007
	3	pUL97	Shire	NCT00411645	2006
	2	pUL97	Shire	NCT00223925	2005
	1	pUL97	Glaxo Wellcome	NCT00002373	2001
Letemovir	3	pUL56	Merck Sharp & Dohme Corp	NCT02137772	2014

PERSPECTIVES THERAPEUTIQUES

Afin de pallier la toxicité des traitements disponibles et l'émergence de mutations de résistance, de nouveaux antiviraux sont en cours de développement. De nombreuses voies sont explorées avec de nouveaux inhibiteurs de la polymérase, des molécules ciblant des voies de la réplication cellulaire interférant avec la réplication virale (artésunate et dérivés) mais également avec des molécules ciblant de nouvelles protéines virales (maribavir, letermovir).

Deux inhibiteurs de la polymérase pUL54 sont en développement. Le brincidofovir est une prodrogue du cidofovir conjugué à un lipide qui présente une meilleure biodisponibilité. Il a été proposé en prévention de la maladie à CMVH en essai clinique de phase III. Le bénéfice de l'utilisation du brincidofovir en thérapeutique lors d'infections résistantes au CMVH a été récemment montré, bien que les mutations de résistance du gène *UL54* puissent limiter son efficacité thérapeutique. Ces résultats devront être confirmés par des essais cliniques (**Vial et al., 2017**). Le cyclopropavir, un dérivé proche du ganciclovir, est phosphorylé par pUL97 et présente un profil de résistance différent. Il est encore en évaluation préclinique (**Chou et al., 2012**) (**Tableau I**).

L'artésunate, un dérivé semi-synthétique de l'artémisine, est originalement préconisé dans le traitement des accès palustres graves. Cette molécule, possède une activité antivirale contre des souches de CMVH sauvages et résistantes au GCV, justifiant son utilisation en ATU en cas d'infection à CMVH résistante aux anti polymérase (**Kaptein et al., 2006**) (**Chou et al., 2011**). Cependant son utilisation en prévention de la maladie à CMVH n'a pas été poursuivie en raison d'une efficacité médiocre sur la charge virale CMVH (**Wolf et al., 2011**). Bien que le mécanisme d'action ne soit pas totalement élucidé, l'artésunate semble interférer avec la voie NF- κ B. Des études ont notamment décrit une inhibition de la fixation à l'ADN de la sous-unité RelA/p65 du facteur NF- κ B (**Lyss et al., 1998**). Des dérivés de l'artésunate sont actuellement en phase pré-clinique (**Hutterer et al., 2015**) (**Tableau I**).

Dans les années 1990, des composés benzimidazoles D-ribonucléosides ciblant une étape exclusivement virale, l'encapsidation du génome, en interagissant avec les protéines du complexe terminase, TCRB ou 2,5,6-trichloro-1-(β -D-ribofuranosyl)benzimidazole, BDCRB ou

2-bromo-5,6-dichloro-1-(β -D-ribofuranosyl)benzimidazole et dérivés ont été développés (**Townsend et al., 1995**). Bien qu'il soit établi que ces composés ciblent les sous-unités du complexe terminase (pUL56 et pUL89), leur mode d'action reste à ce jour mal connu. Ces molécules, par ailleurs bons candidats en raison de leur efficacité et de leur faible toxicité, ont néanmoins été abandonnées du fait de leur faible biodisponibilité (**Williams et al., 2003**).

Le maribavir ou 2-isopropylamino-5,6-dichloro-1-(β -L-ribofuranosyl)benzimidazole est également un dérivé benzimidazolé mais dont la cible est la kinase pUL97 (**Chulay et al., 1999**) (**Biron et al., 2002**) (**Evers et al., 2004**). Le maribavir, dérivé lévogyre du BDCRB, présente une faible toxicité et une bonne biodisponibilité (**Koszalka et al., 2002**). Lors des premiers essais cliniques de phase III, son efficacité en prophylaxie à faible doses n'a pas été démontrée (**Marty et al., 2011**). Cependant son efficacité à forte dose en cas d'infection résistante aux anti polymérase (**Avery et al., 2010**) (**Alain et al., 2013**) a justifié la poursuite de son développement clinique. Depuis 2016, deux nouvelles études de phase III sont en cours avec de fortes doses de maribavir, l'une en prévention et l'autre en traitement des patients greffés non répondeurs aux antiviraux usuels (**Tableau I**).

Toutefois, plusieurs études ont également montré l'émergence de mutations de résistance au maribavir localisés au sein de pUL97 mais aussi de pUL27 (**Komazin et al., 2003**) (**Chou et al., 2007**) (**Chou et al., 2013**).

Une nouvelle molécule de la classe des quinazolines, le letermovir ciblant également l'encapsidation du génome viral, en interagissant avec les protéines du complexe terminase a par la suite été développée (**Goldner et al., 2011**). Les données précliniques du letermovir montrent une très forte activité antivirale. De plus, cette molécule présente, par comparaison aux autres molécules antivirales, une faible toxicité (**Lischka et al., 2010**). Les essais cliniques de phase I et II confirment ces données précliniques (**Stoelben et al., 2014**). La molécule est bien tolérée et sans effet secondaire notable. De plus, comparée à une molécule placebo, le letermovir montre une forte activité en prophylaxie chez les receveurs de greffes de cellules souches hématopoïétiques. La réduction de l'incidence de l'infection à CMVH est dose-dépendante, et la dose maximale utilisée (240mg) est celle montrant la meilleure efficacité anti-CMVH (**Chemaly et al., 2014**) (**Tableau I**).

L'émergence de résistance a été démontrée *in vitro*. Les premières mutations observées ont été localisées dans la partie N- terminale de pUL56 à proximité du potentiel

motif doigt de zinc (**Goldner et al., 2014**). En 2016, Sunwen Chou (Oregon Health & Science University, Portland, USA) a mis en évidence *in vitro* l'émergence de mutations au sein de pUL89 conférant une faible résistance au letermovir (D344E, N320H et M359I) (**Chou Sunwen. 2016. ASM Microbe Meeting. Boston MA, Abstract Monday-409**) (**Chou, 2017**). Plus récemment, S. Chou a montré *in vitro* l'émergence d'une potentielle mutation de résistance (P91S) au letermovir au sein de pUL51. La caractérisation phénotypique du virus recombinant a confirmé que la mutation seule conférait une résistance 2,4 fois supérieure au letermovir par rapport à la souche de référence, et lorsque cette mutation est combinée avec les mutations *UL56* S229F ou R369M, elle multiplie le niveau de résistance conféré par ces mutations de 3 à 6 fois. Ainsi, des mutations de résistance au letermovir sont détectées au niveau des trois principales sous-unités du complexe terminase (pUL56-pUL89-pUL51). Ces résultats suggèrent que le letermovir inhibe une fonction biologique impliquant une interaction des trois sous-unités telle que la fixation aux séquences « *pac* », le clivage et la translocation d'une unité de génome dans une pro-capside. Bien que pUL51 soit essentielle et impacte la localisation du complexe terminase par son interaction avec la sous-unité pUL56, son rôle biologique n'est à ce jour pas bien compris. En raison des connaissances limitées sur la structure des protéines du complexe terminase, il est difficile de déterminer si les mutations de résistance au letermovir dans les trois gènes identifient des sites d'interactions ou des sites de fixation du letermovir (**Chou Sunwen. 2017. 6th International Congenital CMV Conference / 16th International CMV/betaherpesvirus Workshop, Abstract CD-PP-003**) (**Chou, 2017**).

Les dérivés benzimidazolés ou les quinazolines ne nécessitent pas, pour être actifs, d'être phosphorylés par la kinase pUL97. Ainsi, ces composés sont efficaces contre les souches multi-résistantes aux molécules actuellement utilisées en clinique. Enfin, de par la forte conservation du mécanisme d'encapsidation chez les herpès virus, ces différentes molécules pourraient être envisagées dans des stratégies de thérapies à spectre large (**Williams et al., 2003**).

*La revue « **Human cytomegalovirus terminase complex as an antiviral target, a close up view** » présentée dans le chapitre « **Exploration du complexe terminase** » présente notamment l'efficacité et les limites du letermovir.*

Tableau II : Vaccins en cours de développement. Adapté de Schleiss, 2016.

Vaccine category	Phase	Vaccine	Antigens used	Manufacturer	Identifier	First received
Attenuated vaccines	1	V160-001		Merck	NCT01986010	2013
	1	Towne-Toledo Chimera		CMV Research Foundation, International AIDS Vaccine Initiative	NCT01195571	2010
	1	VCL-CT02, plus Towne CMV	gB, pp65, IE1	UC-SF, Vical	NCT00370006	2006
	1	VCL-CT02, plus Towne CMV	gB, pp65, IE1	UC-SF, Vical	NCT00373412	2006
Subunit vaccines	1	GSK1492903A	gB	GSK	NCT00435396	2007
	1	GSK1492903A	gB	GSK	NCT01357915	2011
	2	gB/MF59	gB	NIAID	NCT00133497	2005
	2	gB/MF59	gB	NIAID	NCT00815165	2008
	2	gB/MF59	gB	Robert Pass, NIAID, Sanofi Pasteur	NCT00125502	2005
	2	gB subunit	gB	University College, London, NIAID	NCT00299260	2006
	2	gB subunit	gB	University College, London	NCT00299260	2006
Peptides vaccines	1	CMVpp65-A*0201 peptide; containing either helper T lymphocyte (HTL) PADRE peptide or tetanus toxoid peptide	pp65; T cell epitope fused to either PADRE or CMV tetanus epitope	City of Hope, NCI	NCT00712634	2008
	1	CMVpp65-A*0201 peptide; containing either helper T lymphocyte (HTL) PADRE peptide or tetanus toxoid peptide	pp65; T cell epitope fused to either PADRE or CMV tetanus epitope	City of Hope, National Cancer Institute	NCT00722839	2008
	1	Tetanus-HCMVpp65 fusion peptide (CMVpp65-A*0201; CMVPepVax)	pp65; T cell epitope fused to tetanus epitope	City of Hope, National Cancer Institute	NCT01588015	2012
	2	Tetanus-HCMVpp65 fusion peptide (CMVpp65-A*0201; CMVPepVax)	pp65; T cell epitope fused to tetanus epitope	City of Hope, National Cancer Institute	NCT02396134	2015
DNA (plasmid) vaccines	1	ASP0113	pp65, gB	Astellas, Vical	NCT02103426	2014
	2	ASP0113	pp65, gB	Astellas	NCT01903928	2013
	2	ASP0113	pp65, gB	Astellas, Vical	NCT01974206	2013
	2	VCL-CB01	pp65, gB	Astellas, Vical	NCT00285259	2006
	3	ASP0113	pp65, gB	Astellas, Vical	NCT01877655	2013
Vectored vaccines	1	AVX601	gB, pp65, IE1	AlphaVax, Inc (Novartis, GSK)	NCT00439803	2007
	1	HCMV-MVA Triplex	pp65, UL123/IE1-exon4, UL122/IE2-exon5	City of Hope, National Cancer Institute	NCT01941056	2013
	1	HB-10	gB, pp65	Hookipa Biotech	NCT02798692	2016
	2	ALVAC-pp65	pp65	NHLBI	NCT00353977	2006
	2	HCMV-MVA Triplex	pp65, UL123/IE1-exon4, UL122/IE2-exon5	City of Hope, National Cancer Institute	NCT02506933	2015

VERS UN VACCIN EN PROPHYLAXIE

La vaccination pourrait prévenir la majorité des anomalies congénitales causées par des infections congénitales à CMVH. Par ailleurs, un vaccin contre le CMVH pourrait permettre de protéger les sujets immunodéprimés à risque de complications liées à une primo-infection à CMVH. Ainsi, la vaccination pourrait être destinée aux femmes séronégatives avant une grossesse ou aux transplantés séronégatifs.

Les premiers essais remontent aux années 70. Les approches étaient alors concentrées sur le développement de vaccins atténués en terme de pouvoir pathogène produits à partir de la souche de référence Towne puis AD169 (**Elek and Stern, 1974**) (**Neff et al., 1979**). Les résultats de ces essais ont néanmoins été décevants (**Stern, 1984**). Une autre approche a consisté au développement d'une chimère présentant les caractéristiques de la souche Toledo ainsi que l'atténuation de la souche Towne. Les candidats vaccins chimériques ont été bien tolérés et n'ont pas causé d'infection systémique (**Heineman et al., 2006**) (**Adler et al., 2016**).

A ce jour, les vaccins candidats à une entrée en évaluation clinique reposent sur des souches virales modifiées et atténuées, des combinaisons protéiques basées sur des glycoprotéines virales incluant la glycoprotéine B (gB) (**Schleiss, 2005**), des approches de vaccination vectorisées permettant l'expression d'antigènes comme la glycoprotéine B et/ou la phosphoprotéine pp65. Une stratégie vaccinale plus récente s'appuie sur une immunisation à partir de peptides synthétiques imitant les épitopes principaux de protéines virales immunogènes. Les essais cliniques en cours ou récemment terminés sont résumés dans le **Tableau II**.

En dépit des nombreuses avancées sur le développement de vaccins contre le CMVH, une meilleure compréhension de la triade maternelle-placentaire-fœtale est nécessaire afin d'identifier des cibles potentielles. En effet, la détermination des paramètres immunologiques et virologiques qui sont en corrélation avec une protection de la transmission à l'interface materno-fœtale est essentiel pour l'optimisation des candidats vaccins disponibles ou futurs.

NOUVELLES CIBLES THERAPEUTIQUES

EXPLORATION DU COMPLEXE TERMINASE

*Ce chapitre du manuscrit a fait l'objet d'une revue invitée pour publication dans « **FEMS Microbiology Reviews** », en cours de révision. Nous présentons dans cette revue d'une part les connaissances structurales et fonctionnelles actuelles sur les protéines du complexe terminase du CMVH. Et d'autre part, nous discutons du caractère spécifique du mécanisme d'action du letermovir.*

Human cytomegalovirus terminase complex as an antiviral target, a close-up view

Ligat, G., Cazal, R., Hantz, S., Alain, S.

FEMS Microbiol Rev., Invited review, Under Review.

FEMS Microbiology Reviews


 OXFORD
UNIVERSITY PRESS

FEMS Microbiology Reviews

<http://mc.manuscriptcentral.com/fems>
Human cytomegalovirus terminase complex as an antiviral target, a close-up view

Journal:	<i>FEMS Microbiology Reviews</i>
Manuscript ID	FEMSRE-17-02-0014.R1
Manuscript Type:	Review Article
Date Submitted by the Author:	n/a
Complete List of Authors:	Ligat, Gaetan; Université Limoges, INSERM, CHU Limoges, UMR 1092; CHU Limoges, Laboratoire de Bactériologie-Virologie-Hygiène, National Reference Center for Cytomegaloviruses (NRC) Cazal, Raphael; Université Limoges, INSERM, CHU Limoges, UMR 1092; CHU Limoges, Laboratoire de Bactériologie-Virologie-Hygiène, National Reference Center for Cytomegaloviruses (NRC) Hantz, Sebastien; Université Limoges, INSERM, CHU Limoges, UMR 1092; CHU Limoges, Laboratoire de Bactériologie-Virologie-Hygiène, National Reference Center for Cytomegaloviruses (NRC) Alain, sophie; Université Limoges, INSERM, CHU Limoges, UMR 1092; CHU Limoges, Laboratoire de Bactériologie-Virologie-Hygiène, National Reference Center for Cytomegaloviruses (NRC)
Keywords:	Cytomegalovirus, DNA-packaging, Terminase, Letermovir


 SCHOLARONE™
Manuscripts

ScholarOne Support 1-434/964-4100

1
2
3 **1 Human cytomegalovirus terminase complex as an antiviral target, a close-up view**
4
5
6
7
8
9

10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60

4 G. Ligat^{1,2}, R. Cazal^{1,2}, S. Hantz^{1,2}, S. Alain^{1,2}

5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60

6 Affiliations:

7 ¹Université Limoges, INSERM, CHU Limoges, UMR 1092, Limoges, France

8 ²CHU Limoges, Laboratoire de Bactériologie-Virologie-Hygiène, National Reference Center
9 for Cytomegaloviruses (NRC), Limoges, France

10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60

12 Corresponding author:

13 Sophie Alain UMR 1092, CBRS, Hopital Dupuytren, 2 avenue ML King, 87000 Limoges.

14 sophie.alain@unilim.fr

15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60

17 **Abstract**

18 Human cytomegalovirus (HCMV) is responsible for life-threatening infections in
19 immunocompromised individuals and can cause serious congenital malformations. Available
20 antivirals target the viral polymerase inducing cross-resistance and toxicity. Hence, new
21 antivirals targeting other stages of replication and inducing fewer side effects represent a real
22 unmet need. During HCMV replication, DNA maturation and packaging are performed by the
23 terminase complex that cleaves DNA to package genome into the capsid. Identified in
24 herpesviruses and bacteriophages, without any counterpart in mammalian cells, these
25 terminase proteins are ideal targets for highly specific antivirals. A new terminase inhibitor,
26 the letermovir, recently proved effective against HCMV in phase III clinical trials. However,
27 the mechanisms of action still remains unknown. Letermovir is specific for HCMV since no
28 significant activity was detected against any other herpesvirus or non-human CMV. These

1
2
3 29 findings support the hypothesis that letermovir exerts a specific mechanism of action. In this
4
5 30 review, we focus on the highly conserved mechanism of DNA packaging, highlighting the
6
7 31 terminase complex as an antiviral target. We present the intrinsic mechanism of DNA
8
9 32 packaging to allow an overview of the structure and function relationship of HCMV
10
11 33 terminases. Finally, we propose a possible explanation of the specific mechanism of action of
12
13
14 34 letermovir.
15

16 35

17
18 36 **Keywords**

19
20 37 Cytomegalovirus, DNA packaging, Terminase, Letermovir
21
22

23 38

24 39

25 40

26 41

27 42

28 43

29 44

30 45

31 46

32 47

33 48

34 49

35 50

36 51

37 52

38 53

39 54

40 55

41 56

42 57

43 58

44 59

45 60

54 Introduction

55 Human Cytomegalovirus (HCMV) belongs to the betaherpesviruses, with a double-stranded
56 DNA of approximately 230 kpb encoding over 200 proteins. Like other members of this
57 subfamily, its main characteristics are high species specificity, various cell-targets and slow
58 replication in cell culture. Otherwise, HCMV persists in a latent stage after primary infection
59 and is able to manipulate the immune system through a large number of viral proteins. In
60 healthy individuals, primary infection usually leads to an asymptomatic form or to self-
61 limited febrile illness. The viremia is rapidly controlled by cell-mediated immunity and
62 HCMV establishes life-long latency in various cells. Viral reactivation can occur and can lead
63 to serious and life-threatening complications in immunocompromised individuals. Despite
64 significant improvements in diagnostic and therapeutic management, CMV remains a
65 significant problem in immunocompromised individuals, including solid organ and
66 hematopoietic stem cell transplant recipients and human immunodeficiency virus (HIV)
67 infected patients (Torres-Madriz and Boucher 2008). HCMV is also the most common
68 infectious cause of congenital malformation associated with developmental delay,
69 sensorineural hearing loss and fetal death for 10-15% of congenitally infected newborns. To
70 date the only drugs licensed for the treatment of HCMV infection and disease are ganciclovir
71 or GCV (Cymevene®), valganciclovir or VGCV (Valcyte®), cidofovir or CDV (Vistide®)
72 and foscarnet or FOS (Foscavir®), all targeting the viral polymerase. In addition, acyclovir
73 products are approved for the prevention of HCMV in the EU. One of the limitations of these
74 antivirals is their significant dose-limiting toxicity. Furthermore, prolonged therapy or low
75 dosage can favour resistance to molecules with potential cross-resistance to currently
76 available therapies. Resistance mutations map either in the *UL97* kinase, for GCV, or in the
77 *UL54* polymerase leading to various levels of cross-resistance to all other available antivirals
78 (Lurain and Chou 2010) (Chou 2015a) (Chaer, Shah and Chemaly 2016). Recent attempts to

1
2
3 79 identify novel anti-HCMV compounds concentrated mainly on novel drug targets such as the
4
5 80 *UL97* viral kinase (for maribavir) or the viral terminase complex involved in viral DNA
6
7 81 cleavage/packaging. Several molecules targeting the terminase proteins have been discovered
8
9 82 (e.g., BDCRB, GW275175X, and BAY 38-4766 benzimidazole derivatives) (Underwood *et al.*
10
11 83 *al.* 1998) (Reefschlaeger *et al.* 2001) (Williams *et al.* 2003) (Dittmer *et al.* 2005) but until
12
13 84 now, none of them has reached phase 2 or 3 clinical development, mainly for biodisponibility
14
15 85 concerns. Letermovir (also known as AIC246) is derived from a novel chemical class, the
16
17 86 quinazolines (Lischka *et al.* 2010a), and acts via a novel, not fully understood mechanism of
18
19 87 action involving the viral terminase protein pUL56 (Goldner *et al.* 2011a). Wildum *et al.*
20
21 88 showed the absence of antagonistic effects during the combination of letermovir with current
22
23 89 polymerase inhibitors or with anti-HIV drugs (Wildum, Zimmermann and Lischka 2015).
24
25 90 Recently, another compound was identified and showed potential to inhibit a subunit of the
26
27 91 HCMV terminase complex (Wang *et al.* 2016), suggesting letermovir could be used in
28
29 92 combination therapy. Wang and collaborators found that a hydroxypyridonecarboxylic acid
30
31 93 compound, previously reported as an inhibitor of human immunodeficiency virus RNase H,
32
33 94 could also inhibit pUL89 at low concentrations. These results suggest that pUL89 may also
34
35 95 present a potential target for the development of antiviral drugs against HCMV. Here, we
36
37 96 review the structure and function of the terminase complex proteins of HCMV, targets of
38
39 97 novel inhibitors, to better understand the mechanism of action of terminase inhibitors.
40
41
42
43
44

98

99 **Cleavage/packaging, a highly conserved mechanism**

100 Genome packaging of viruses is generally performed according two main strategies. Either
101 the virus assembles its genome with a capsid around it, like the human immune deficiency
102 virus (HIV), or the genome is packed into a preformed procapsid. dsDNA viruses like tailed
103 bacteriophages, herpesviruses and HCMV particularly, use the latter strategy for DNA

1
2
3 104 packaging. Herpesviruses and most of bacteriophages produce large concatemers during
4
5 105 genome replication and then require a motor to perform the cleavage/packaging. For the
6
7 106 family of herpesviruses, knowledge concerning DNA packaging is limited. However, several
8
9 107 parallels have been drawn with the analogous process in extensively studied dsDNA
10
11 108 bacteriophages and have led to the hypothesis of a common ancestry. DNA replication into
12
13 109 concatemeric DNA, capsid architecture and encapsidation process are part of these analogies
14
15 110 (Baker *et al.* 2005). Many studies highlighted the similarities among bacteriophages but also
16
17 111 between bacteriophages and herpesviruses. Herpes simplex virus 1 (HSV-1) DNA packaging
18
19 112 ATPase is highly homologous to the large terminase subunit of bacteriophages (Przech, Yu
20
21 113 and Weller 2003). Packaging mechanisms of bacteriophages such as λ , T3, T7, that cut at
22
23 114 specific sites along the concatemer are close to that of herpesviruses and therefore present a
24
25 115 good model to further study genome packaging within herpesviruses. The following section
26
27 116 describes current knowledge of the terminase complex of human cytomegalovirus obtained
28
29 117 from findings partly based on extrapolation from studies on bacteriophages and other
30
31 118 herpesviruses.
32
33
34
35
36
37

38 120 **Cleavage/packaging and the HCMV terminase complex**

39
40 121 As shown for some bacteriophages like bacteriophage λ , studies have confirmed that
41
42 122 circularization of the herpesvirus genome occurs early during infection and that circularized
43
44 123 molecules act as templates for DNA replication. DNA replicates according to an origin-
45
46 124 dependent theta mechanism, in which circular templates are amplified. This step is followed
47
48 125 by a rolling circle-based mode of replication producing concatemers of the genome in head-
49
50 126 to-tail fashion, that further act as substrates for the encapsidation process (McVoy and Adler
51
52 127 1994). A viral protein complex called terminase then cleaves concatemeric HCMV DNA into
53
54 128 unit length genomes for encapsidation. This involves site-specific cleavage at AT-rich core
55
56
57
58
59
60

1
2
3 129 sequences within *pac* motifs (“*cis-acting packaging signal*”) located in the “*a*” sequence of
4
5 130 the terminal and internal repeat segments (Fig. 1). In general, terminase complexes are hetero-
6
7 131 oligomers composed of two core proteins (pUL56 and pUL89 for HCMV), each carrying a
8
9 132 different function required for the packaging process that are associated with several essential
10
11 133 cofactors of yet unknown function. Mutations in any of the encoding genes lead to the
12
13 134 accumulation of empty procapsids (proheads or A capsids) and uncleaved DNA concatemers
14
15 135 (Rao and Feiss 2015). HCMV packaging starts when a packaging signal called *pac* sequence
16
17 136 is recognized on concatemeric DNA by the viral terminase complex. The functional
18
19 137 packaging holocomplex, a hetero-oligomer composed of pUL56, pUL89 and pUL51 proteins,
20
21 138 performs a first specific cut generating a free end at which further packaging is initiated. The
22
23 139 DNA/terminase complex then binds to an empty preformed procapsid at its unique portal
24
25 140 vertex, across which the DNA is then translocated. A second site-specific cleavage occurs to
26
27 141 terminate packaging when a unit length genome has been translocated. Cleavage and
28
29 142 expulsion of the scaffold protein and angularization of the capsid follow DNA packaging.
30
31 143 Knowledge of the DNA-packaging process in bacteriophages and the terminases conservation
32
33 144 allowed to constitute a theoretical model of this process in HCMV (Bogner, Radsak and
34
35 145 Stinski 1998). Cleavage-packaging steps happen as follows: (steps numbers refer to respective
36
37 146 numbers in Fig. 2) 1) after their translocation into the nucleus, HCMV terminase proteins act
38
39 147 to 2) specifically bind the *pac* site on concatemeric DNA and recruit the empty capsid, 3)
40
41 148 cleave the duplex, 4) exert its ATPase activity to power translocation of a unit-length DNA
42
43 149 genome into the capsid. Indeed, depletion of ATP has been shown to inhibit HSV-1
44
45 150 packaging and lead to the accumulation of B capsid, an intermediate form containing cleaved
46
47 151 scaffold (Dasgupta and Wilson 1999). 5) complete the packaging process by cutting off
48
49 152 excess DNA at the portal region, leading to C capsids, and finally 6) the DNA/terminase
50
51 153 complex dissociates from the filled capsid and is ready for the next packaging step (Fig. 2)
52
53
54
55
56
57
58
59
60

1
2
3 154 (Bogner, Radsak and Stinski 1998). Unlike the dsRNA motor, the HCMV terminase complex
4
5 155 is a transient component of the viral particle and does not remain in the final virion. The small
6
7 156 subunit, pUL89, seems to dissociate shortly after DNA cleavage, as it has never been detected
8
9 157 together with pUL56 after this step, and is recycled for further cleavage/packaging processes
10
11 158 (Scheffczik *et al.* 2002).

12
13
14 159

15
16 160 **Proteins involved in DNA cleavage/packaging process**

17
18 161 Like the dsDNA bacteriophage terminases, the HCMV terminase complex includes a large
19
20 162 (pUL56) and a small (pUL89) subunit encoding all the functions of “classical” terminases
21
22 163 such as the processing of viral DNA concatemers. Electron microscopic analysis revealed a
23
24 164 toroidal architecture for both proteins, as commonly found for DNA-metabolizing proteins
25
26 165 (Scheffczik *et al.* 2002). Further studies suggest that multimers of pUL56 and pUL89 subunits
27
28 166 gather to form the oligomeric holoenzyme but the exact stoichiometry of the complex remains
29
30 167 unknown. Additionally, the proteins pUL51, pUL52, pUL77 and pUL93 seem to be part of
31
32 168 the terminase complex and/or participate in the DNA cleavage/packaging process (Scheffczik
33
34 169 *et al.* 2002) (Borst *et al.* 2013) (Borst *et al.* 2016) (Köppen-Rung, Dittmer and Bogner 2016)
35
36 170 (DeRussy and Tandon 2015) (DeRussy, Boland and Tandon 2016).

37
38
39
40
41 171

42
43 172 **The large terminase subunit pUL56**

44
45 173 The large subunit of the HCMV terminase complex pUL56 is composed of 12 conserved
46
47 174 regions (I–XII) (Champier *et al.* 2008) and coded by ORF *UL56* located on the unique long
48
49 175 portion of the viral genome (Fig. 3). This highly conserved protein of approximately 130 kDa
50
51 176 was identified and partially characterized due to its homology to the HSV-1 pUL28 which has
52
53 177 an essential role in HSV-1 genome packaging (Bogner *et al.* 1993) (Addison, Rixon and
54
55 178 Preston 1990). When expressed alone, three-dimensional reconstruction from electronic
56
57
58
59
60

1
2
3 179 cryomicroscopy suggests that pUL56 exists as a dimer formed by the association of two
4
5 180 ring-shaped structures connected to each other by a bridge to their base (Savva, Holzenburg
6
7 181 and Bogner 2004). However, to date, no crystal structure has been obtained and its association
8
9 182 with the other proteins of the complex has not been elucidated. Since the identification of
10
11 183 pUL56 as a putative terminase, numerous *in vitro* studies supported this hypothesis
12
13 184 confirming terminase specific activities for this subunit. Using electrophoretic mobility shift
14
15 185 assays, Bogner and colleagues demonstrated a sequence specific interaction of pUL56 with
16
17 186 *pac* motifs within “a” sequences of the viral genome (Bogner, Radsak and Stinski 1998).
18
19 187 Otherwise, a short 128-base-pair sequence containing regulatory cis elements in conjunction
20
21 188 with *pac* motives is sufficient to mediate efficient HCMV genome maturation (Wang and
22
23 189 McVoy 2011). Comparable results were obtained for HSV-1 pUL28 and this specific
24
25 190 interaction is a prerequisite to the processing of viral concatemeric DNA in general (Adelman,
26
27 191 Salmon and Baines 2001). The initiation of the cleavage/packaging process takes place in
28
29 192 nuclear structures known as replication centers where pUL56 accumulates at late times post
30
31 193 infection and co-localizes with pUL112-113 and pUL44, proteins implicated in viral
32
33 194 replication. The nuclear import of pUL56 is mediated by an importin-dependent pathway
34
35 195 through the interaction of hSRP1a and the C-terminal nuclear localization signal (NLS) of
36
37 196 pUL56 (amino acid residues 816-827). Alanine scanning identified arginine 822 and lysine
38
39 197 823 as the essential residues of the NLS of pUL56 for nuclear translocation (Giesen, Radsak
40
41 198 and Bogner 2000). Some results describe that nuclear translocation can still be observed with
42
43 199 just a loss of intra replication centers localization when pUL56 is expressed alone, while other
44
45 200 more recent studies show that pUL56 cannot translocate to the nucleus by itself. When
46
47 201 expressed as recombinant proteins, the co-expression of pUL56 and pUL89 or pUL56/51 is
48
49 202 required for translocation. This could be mediated by each protein harboring partial NLS that
50
51 203 are necessary to work in synergy for translocation, or could be a result of the co-expression
52
53
54
55
56
57
58
59
60

1
2
3 204 itself that might modify the conformation of either one or both proteins exposing a cryptic
4
5 205 NLS. pUL56 and pUL89 play a major role driving the complete cleavage and packaging
6
7 206 process. Co-immunoprecipitation experiments by Hwang and Bogner, detected a specific
8
9 207 interaction between pUL56 C-terminal and pUL89, findings confirmed in a study of Thoma
10
11 208 and colleagues (Thoma *et al.* 2006). However, the precise domain of *UL56* C-terminal
12
13 209 involved in this interaction remains unknown. Furthermore, a recent study has shown a
14
15 210 mutual interplay between terminase subunits pUL56, pUL89 and pUL51 as a prerequisite for
16
17 211 terminases assembly and nuclear localization (Neuber *et al.* 2017). The first step during the
18
19 212 cleavage of concatemeric DNA catalyzed by pUL89, is an essential one and is then followed
20
21 213 by the binding of the terminase complex to a *pac* sequence. It is generally accepted that
22
23 214 pUL56 acts as an “anchor” for pUL89. Moreover, some studies also indicate that pUL56
24
25 215 shows ATP-independent endonuclease activity that seems to be *pac* specific (Bogner, Radsak
26
27 216 and Stinski 1998). Findings from additional studies suggest that pUL56 might also have an
28
29 217 effect on the endonuclease activity driven by pUL89 (Scheffczik *et al.* 2002). These partly
30
31 218 conflicting findings concerning the effects of pUL56 endonuclease activity highlight the need
32
33 219 for further specificity studies, to know if it plays a major role in the packaging process or not
34
35 220 (Scheffczik *et al.* 2002). pUL56 also interacts with the viral portal protein pUL104 during
36
37 221 DNA packaging via the C-terminal part of pUL56. This interaction is crucial during the DNA
38
39 222 cleavage/packaging process and its prevention by the benzimidazole-D ribonucleosides
40
41 223 BDCRB and TCRB can result in an inhibition of HCMV maturation (Krosky *et al.* 1998)
42
43 224 (Dittmer *et al.* 2005). This interaction seems to be slightly different for HCMV terminase
44
45 225 complex from the one observed for HSV-1, where the two subunits of the complex (HSV-1
46
47 226 pUL15 and pUL28) are involved in the interaction (White *et al.* 2003). More importantly, the
48
49 227 viral DNA packaging process is energy-dependent and requires terminase ATPase activity. *In*
50
51 228 *vitro* studies on bacteriophages have shown that ATP hydrolysis generating one ATP allows
52
53
54
55
56
57
58
59
60

1
 2
 3 229 for the encapsidation of two base pairs (Guo, Peterson and Anderson 1987). In almost all
 4
 5 230 bacteriophages the large terminase subunit catalyzes the ATP-dependent translocation of
 6
 7 231 genomic DNA to the proheads (Rao and Feiss 2015). Hwang *et al.*, demonstrated that, for
 8
 9 232 HCMV, the terminases ATPase activity is associated only with pUL56. More precisely,
 10
 11 233 pUL56 ATPase activity is enhanced by up to 30% when it is associated with pUL89 (Hwang
 12
 13 234 and Bogner 2002). A similar mode of action has already been documented for the phage T4
 14
 15 235 terminase complex with the small subunit gp16 enhancing the large subunits gp17 ATPase
 16
 17 236 activity (Leffers and Rao 2000). Site-directed mutagenesis experiments indicated that glycine
 18
 19 237 and lysin, at positions 714 and 715 respectively at the putative ATP binding site
 20
 21 238 ⁷⁰⁹YNETFGKQ₇₁₆, are essential for ATP hydrolysis (Scholz *et al.* 2003). Apart from these
 22
 23 239 functional and structural studies, identifying mutations conferring resistance to their inhibitors
 24
 25 240 may highlight some essential domains of these proteins. The pUL56 Q204R substitution
 26
 27 241 associated with BDCRB and TCRB resistance is located within a putative zinc finger
 28
 29 242 implicating this region in the benzimidazole D-ribonucleoside mechanism of action
 30
 31 243 (Champier *et al.* 2008) (Krosky *et al.* 1998) while mutations conferring resistance to
 32
 33 244 letermovir are located in a non conserved region. Q204R does not confer resistance to this
 34
 35 245 antiviral (Lischka *et al.* 2010a) (Chou 2015b) (Fig. 3). This underlines the different
 36
 37 246 mechanisms of action of these drugs, but also the need to further explore the possible
 38
 39 247 functional role of these domains.
 40
 41
 42
 43
 44
 45
 46
 47
 48
 49
 50
 51
 52
 53
 54
 55
 56
 57
 58
 59
 60

249 **The small terminase subunit pUL89**

250 The small subunit of the HCMV terminase complex is the gene product of ORF *UL89* located
 251 on the unit long of the viral genome. *In vitro* translation and eukaryotic expression
 252 demonstrated that pUL89 is an 70-75 kDa protein as a monomer and 150 kDa when
 253 dimerized (Hwang and Bogner 2002) (Thoma *et al.* 2006). pUL89 is a homolog of the HSV-1

1
2
3 254 pUL15 protein and was initially studied and identified as a terminase subunit of the HCMV
4
5 255 terminase complex by Hwang *et al.* First, a previous study by Davison *et al.* demonstrated
6
7 256 similarities in the amino acid sequence of the HCMV pUL89 and the gp17 large terminase
8
9 257 subunit of phage T4. Due to the high homology of a part of pUL89 to the ATP binding motif
10
11 258 of the bacteriophage T4 gp17 subunit, the role of pUL89 in HCMV DNA packaging was
12
13 259 investigated (Davison 1992) (Hwang and Bogner 2002). A later *in silico* study (Champier *et*
14
15 260 *al.* 2007) analyzing the amino acid sequences of pUL89 identified the four motifs involved in
16
17 261 the ATPase center domains located in its N-terminal that had been identified by Mitchell *et al.*
18
19 262 for the gp17 large terminase subunit of the bacteriophage T4 (Mitchell *et al.* 2002). The
20
21 263 adenine binding site (₁₅₆EPFQ₁₅₉ in HCMV), the Walker A box or motif I (₂₁₃PRRHGKT₂₁₉
22
23 264 motif in HCMV), Walker B box or motif II (₃₀₅LLLVDEAHFI₃₁₄ in HCMV), and motif III
24
25 265 (₃₃₇SST₃₃₉ in HCMV pUL89) were identified (Champier *et al.* 2007) (Figure 4). In spite of its
26
27 266 partial homology to the gp17 large terminase subunit of the bacteriophage T4, the HCMV
28
29 267 pUL89 did not exhibit enzymatic ATPase activity but was shown to enhance by about 30%
30
31 268 the pUL56-associated ATPase activity described in the previous paragraph, indicating a direct
32
33 269 interaction of pUL89 with pUL56 (Hwang and Bogner 2002) (Leffers and Rao 2000). *In vitro*
34
35 270 binding assays using GST-fusions, HCMV- Δ UL89 mutant and BAC complementation
36
37 271 experiments indicated that the domain 580-600 of pUL89 is necessary for the binding of
38
39 272 pUL89 with pUL56 (Thoma *et al.* 2006). This short domain was then studied *in silico* and its
40
41 273 structure resolved as an alpha helix (Couvreux *et al.* 2010). The crystal structure obtained for
42
43 274 the pUL89 C-terminal region revealed that this domain corresponds to an exposed helix with
44
45 275 three fully conserved residues (Lys583, Ala586, and Asn595), probably representing the
46
47 276 interaction domain between pUL56 and pUL89 (Nadal *et al.* 2010). This interaction is likely
48
49 277 to take place in the cytoplasm and then the terminase proteins are translocated to the nucleus.
50
51 278 Two putative NLS have been proposed to catalyze the nuclear trans-localization of pUL89,
52
53
54
55
56
57
58
59
60

1
2
3 279 though no experimental evidence could be obtained supporting this hypothesis (Champier *et*
4
5 280 *al.* 2007). Recent findings indicate that the pUL89 subunit translocates to the nucleus only
6
7 281 upon interaction with pUL56 and otherwise remains exclusively in the cytoplasm (Wang *et al.*
8
9 282 2012). This leads to the hypothesis that a partial NLS or a cryptic NLS may be present and
10
11 283 activated upon pUL56 and pUL89 interaction. Experiments in the presence of
12
13 284 phosphonoacetic acid, blocking the viral polymerase at the pyrophosphate site, showed that
14
15 285 the localization of pUL89 is dependent on viral replication (Thoma *et al.* 2006). Both HCMV
16
17 286 terminase subunits showed to have a random nuclease activity *in vitro*. Nevertheless, it has
18
19 287 been suggested that pUL56 is unable to exert specific cleavage by itself and that again the
20
21 288 synergy with pUL89 is necessary to complete the cleavage steps of the cleavage/packaging
22
23 289 process during HCMV replication (Scheffczik *et al.* 2002). Structural data obtained by Nadal
24
25 290 *et al.* indicate that the C-terminal of pUL89 belongs to the RNase H-like superfamily of
26
27 291 nuclease and polynucleotidyl transferases. It has the characteristic fold of this superfamily
28
29 292 with three conserved acidic residues (Asp463, Glu534 and Asp651) coordinating two Mn²⁺
30
31 293 cations. The D344E and A355T substitutions in pUL89 are associated with BDCRB and
32
33 294 TCRB resistance, implying that pUL89 is also involved in the mechanism of action of
34
35 295 benzimidazole D-ribonucleosides (Krosky *et al.* 1998) (Underwood *et al.* 1998).
36
37
38
39
40
41
42

43 297 **Other proteins of the terminase complex**

44
45 298 Encapsidation of herpesviruses genomes is probably more complex than for bacteriophages
46
47 299 and seems to involve more proteins than the terminase subunits pUL56 and pUL89. Based on
48
49 300 data obtained with alphaherpesviruses mutants, it was suggested that besides the genuine
50
51 301 terminase subunits pUL56 and pUL89, at least four additional HCMV proteins, namely,
52
53 302 pUL51, pUL52, pUL77, pUL93 contribute to this process. These proteins are homologous to
54
55 303 the HSV-1 proteins pUL33, pUL32, pUL25, and UL17 respectively (Borst *et al.* 2008) (Borst
56
57
58
59
60

1
2
3 304 *et al.* 2013) (Borst *et al.* 2016) (Köppen-Rung, Dittmer and Bogner 2016) (DeRussy and
4
5 305 Tandon 2015) (DeRussy, Boland and Tandon 2016). To date, knowledge about these HSV-1
6
7 306 proteins is limited. HSV-1 pUL33 interacts with the HSV-1 terminase proteins pUL15,
8
9 307 pUL28, and the portal protein pUL6 (Beard, Taus and Baines 2002). Although HSV-1 pUL32
10
11 308 is required for both DNA cleavage and packaging, the HSV-1 pUL25 is not required for DNA
12
13 309 cleavage but is necessary for efficient packaging (McNab *et al.* 1998). Recent findings
14
15 310 indicate that knockdown of HCMV pUL51 results in absence of DNA-filled C capsids in
16
17 311 infected cells, suggesting a role of pUL51 in packaging the HCMV DNA into capsids.
18
19 312 Moreover, pUL51 interacts with the large and small HCMV terminase subunits pUL56 and
20
21 313 pUL89 and mediates their correct subnuclear localization (Borst *et al.* 2013). In pUL52
22
23 314 deletion mutants, viral concatemers remain uncleaved, however pUL52 does not seem to be
24
25 315 involved in nuclear localization of the pUL56 and pUL89 subunits. Furthermore, in contrast
26
27 316 to other packaging proteins, pUL52 cannot be detected in viral replication compartments.
28
29 317 Thus, it is suggested that pUL52 might have a distinct function in cleavage-packaging of
30
31 318 HCMV DNA (Borst *et al.* 2008). pUL93 interacts with pUL77 and components of the nuclear
32
33 319 egress complex, namely pUL50, pUL53, and pUL97. Upon knockdown of pUL77 and
34
35 320 pUL93, only B capsids are produced indicating a putative role of these proteins during viral
36
37 321 capsid formation (Köppen-Rung, Dittmer and Bogner 2016) (DeRussy and Tandon 2015)
38
39 322 (DeRussy, Boland and Tandon 2016). Taken together, these data demonstrate an essential role
40
41 323 for these proteins in cleavage/package of HCMV DNA. Despite the putative functions for
42
43 324 these proteins identified so far, their biochemical make up and biological function are poorly
44
45 325 characterized. Additionally, the three-dimensional structure of these proteins could not be
46
47 326 resolved yet and remains unknown.
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60

328 **The HCMV terminase complex as an attractive therapeutic target**

1
2
3 329 To date, three major molecules, ganciclovir, cidofovir and foscarnet, all targeting the HCMV
4
5 330 polymerase pUL54, are routinely used for prevention and treatment of HCMV infection in the
6
7 331 transplant setting. However, emergence of CMV cross-resistance to currently available
8
9 332 antiviral molecules, favoured by long-term exposure to antiviral drugs, low doses, and
10
11 333 prolonged immunosuppression, is a growing therapeutic challenge that is added to the toxicity
12
13 334 of these drugs. Because of hematologic and nephrologic toxicity, these drugs are not
14
15 335 recommended for administration in pregnant women. Thus, new anti-HCMV molecules
16
17 336 coming from closer knowledge of novel targets are needed to be used instead of, or in
18
19 337 combination with, current polymerase pUL54 inhibitors. HCMV terminase complex is a
20
21 338 critical component of the DNA cleavage/packaging process that translocates viral DNA into
22
23 339 an empty capsid. The large subunits pUL56 and pUL89 have an essential role in this process,
24
25 340 containing many of the functional sites required for DNA-packaging. Nevertheless, little is
26
27 341 known about others proteins that belong to the terminase complex. Knowledge on the
28
29 342 interactions between terminase subunits of HCMV can serve as a starting point for the
30
31 343 generation of new antivirals that target the interaction between these essential viral proteins.
32
33 344 The terminase complex is highly CMV-specific, has no counterpart in mammalian cells, and
34
35 345 thus represents a target of choice for new antivirals development. This has been confirmed by
36
37 346 the recent development of letermovir in the transplant setting (Lischka *et al.* 2010a).
38
39 347 Preclinical data suggested that letermovir targets pUL56 (Lischka *et al.* 2010a). It is a potent
40
41 348 antiviral with an *in vitro* antiviral activity surpassing the current gold standard, GCV, by over
42
43 349 400-fold for the 50 % effective concentration (EC50) values (4.5 nM versus 2 µM) and over
44
45 350 2,000-fold the EC90 values (6.1 nM versus 14.5 µM), without significant cytotoxic effects
46
47 351 (Marschall *et al.* 2012) (Goldner *et al.* 2011a) (Lischka *et al.* 2010a). In phase II trials,
48
49 352 letermovir effectively prevented HCMV infection in recipients of allogeneic hematopoietic-
50
51 353 cell transplants with an acceptable safety profile (Chemaly *et al.* 2014). Under investigation in
52
53
54
55
56
57
58
59
60

1
2
3 354 phase III clinical trials since 2014 (by Merck Sharpe and Dohme Corps), letermovir has met
4
5 355 the primary endpoint of these pivotal phase III study (ClinicalTrials.gov Identifier:
6
7 356 NCT02137772). Recent studies shown the effect of hepatic and renal impairment on
8
9 357 letermovir pharmacokinetics. As compared with healthy patient, moderate hepatic impairment
10
11 358 increased exposure to letermovir less than twofold, while severe hepatic impairment increased
12
13 359 letermovir exposure to letermovir fourfold (Kropeit *et al.* 2017a). Moreover, renal impairment
14
15 360 increased exposure to letermovir (Kropeit *et al.* 2017b). The novel mechanism of action
16
17 361 provides new treatment options for patients infected with resistant virus strains. However,
18
19 362 despite good antiviral efficacy, *in vitro* emergence of resistance mutations has been described.
20
21 363 All these letermovir resistance mutations were located outside the functional domains of
22
23 364 pUL56 known to be involved in DNA cleavage/packaging and do not impact viral replicative
24
25 365 capacity (Goldner *et al.* 2014a) (Chou 2015b) (Lischka, Michel and Zimmermann 2016). This
26
27 366 suggests a specific mode of interaction with the terminase complex.
28
29
30
31

32 367

33
34 368 **Divergent evolution of terminase subunits among herpesviruses could explain the**
35
36 369 **selectivity of letermovir for HCMV**

37
38 370 Unlike other viral cleavage/packaging inhibitors, letermovir is remarkably specific for human
39
40 371 cytomegalovirus. The lack of activity against other herpesviruses, which are commonly
41
42 372 detected in immunocompromised hosts, is a real limitation for letermovir clinical use (table
43
44 373 II) (Marschall *et al.* 2012). Marschall *et al.* demonstrated potent *in vitro* activity of letermovir
45
46 374 against 17 HCMV clinical isolates while no significant activity was noted against any other
47
48 375 herpesvirus tested. These findings point towards a mechanism of action distinct from other
49
50 376 cleavage/packaging inhibitors that are less specific and efficient than letermovir for HCMV
51
52 377 treatment. A possible explanation could come from divergent evolution of herpesviruses
53
54 378 terminase subunits. Translocation of cytoplasmic terminase complex in the nucleus involved
55
56
57
58
59
60

1
2
3 379 nuclear localization signal. A recent study showed a divergent evolution of NLS in
4
5 380 herpesviruses terminase subunits. In C-terminal, small terminase as pUL56 have a classical
6
7 381 NLS not conserved in alpha- and gammaherpesviruses. However, in N-terminal, a
8
9 382 monopartite NLS in large terminase was found and conserved only in alphaherpesviruses.
10
11 383 Moreover, a classical NLS, partially conserved, was described in the third terminase. The
12
13 384 authors proposed that herpesviruses regulate the kinetic of translocation in nucleus using
14
15 385 several number, strength and synergy of NLS in terminase subunits, (Sankhala, Lokareddy
16
17 386 and Cingolani 2016). In order to better understand the specificity of letermovir interaction
18
19 387 with the HCMV terminases, we investigated the localization of letermovir resistance
20
21 388 mutations related to conserved domains of pUL56 identified by Champier *et al.* 2008. The
22
23 389 potential impact of naturally occurring *UL56* sequence variations upon susceptibility to
24
25 390 letermovir was recently investigated using a panel of 74 letermovir-naïve clinical HCMV
26
27 391 isolates (Lischka *et al.* 2016). The authors confirmed that the majority of the identified
28
29 392 polymorphisms were located within the 2 variable *UL56* regions (VRI and VRII; Figure 3)
30
31 393 but importantly none were located at positions within the putative letermovir resistance region
32
33 394 AA230 to AA370. This strongly suggests that all residues known to be associated with
34
35 395 letermovir resistance are highly conserved, though, they are not always located within
36
37 396 conserved domains. Interestingly, the R369M/G/S substitution conferring high-level
38
39 397 resistance is located in the conserved region VI (Fig. 3) (Goldner *et al.* 2014a). Among
40
41 398 herpesviruses, R369 was found only in the HCMV and HHV-6-B large terminase subunits. In
42
43 399 other herpesviruses, the arginine is substituted by an aspartate in HSV-1, HSV-2, HHV-4_1
44
45 400 and HHV-4_2, an asparagine in HHV-6A-GS, a serine in HHV-3 or a lysine in MCMV and
46
47 401 RCMV. These substitutions could probably explain the lack of efficacy of letermovir for these
48
49 402 herpesviruses (Fig. 5). Unlike other herpesviruses, HHV-6B have an arginine in position 369
50
51 403 like HCMV but, to date, the HHV-6B sensitivity to letermovir has not been tested and this
52
53
54
55
56
57
58
59
60

1
2
3 404 should be confirmed by further antiviral assays. The lack of activity associated with serine
4
5 405 substitution can be due to the change of size of the amino acid that could impair the
6
7 406 letermovir to fit in HCMV or HHV-3 terminase subunit. One hypothesis for aspartate is the
8
9 407 presence of a negative charge. The presence of a shorter side chain can explain the lack of
10
11 408 activity with the asparagine substitution. We investigated other letermovir resistance mutation
12
13 409 positions and polymorphisms on these positions among herpesviruses. Interestingly, we found
14
15 410 that most of resistance residues were found in other herpesviruses such as HHV_1 or HHV_2.
16
17 411 For instance, L241P substitution that confers resistance was also found in all
18
19 412 alphaherpesviruses and was substituted by a G (smaller residue) in other betaherpesviruses
20
21 413 (Fig. 5). It could be interesting to survey the relative capacity of emergence of these mutations
22
23 414 in the clinical setting. Indeed, since these mutations already exist in other herpesviruses, there
24
25 415 could be an advantage for the selection of these substitutions during the viral replication in the
26
27 416 clinical context. The divergence of sequences and thus terminase subunits conformation could
28
29 417 explain the letermovir HCMV-specificity.
30
31
32
33

34 418

35
36 419 **Concluding remarks**

37
38 420 The terminase complex is highly HCMV-specific, has no counterpart in the cell, and thus
39
40 421 represents a target of choice for new antivirals development. To understand the HCMV
41
42 422 cleavage/packaging process and elucidate both structure and function of the necessary
43
44 423 components will allow the development of better targeted antivirals with high specificity and
45
46 424 low toxicity. Furthermore, elucidating the mechanism of action of letermovir and identifying
47
48 425 new patterns as potential targets within the complex could improve the development of new
49
50 426 inhibitors of the terminase family, not only against HCMV but also against other
51
52 427 herpesviruses. Indeed, one major limitation of letermovir is its lack of activity against other
53
54 428 herpesviruses that commonly infect immunocompromised patients. Although letermovir has
55
56
57
58
59
60

1
2
3 429 no activity against other herpesviruses, pUL56 and homologues sequences conservation
4
5 430 suggest that letermovir derivatives should generate more effective antiviral drugs. Otherwise,
6
7 431 combining antiviral drugs with different mechanisms of action is a proven strategy to increase
8
9 432 antiviral efficiency and limit emergence of resistance mutations. Use of letermovir could also
10
11 433 limit additional toxicity. The combination of drugs including letermovir with available
12
13 434 polymerase pUL54 inhibitors could hold potential in the future to treat HCMV resistant
14
15 435 infections or HIV-infected patients with HCMV reactivation.
16
17

18 436

19
20
21 437 **Acknowledgements**

22
23 438 The authors gratefully acknowledge MC Ploy for her helpful advice, E Buelow and S Demai
24
25 439 for help in reviewing the English and L Roland for his help in a figure.
26

27 440

28
29 441

30
31 442

32
33 443

34 444

35 445

36 446

37 447

38 448

39 449

40 450

41 451

42 452

43 453

44 454

45 455

46 456

47 457

48 458

49 459

50 460

51 461

52 462

53 463

54 464

55
56
57
58
59
60

- 1
2
3 465 Addison C, Rixon FJ, Preston VG. Herpes simplex virus type 1 UL28 gene product is
4 466 important for the formation of mature capsids. *J Gen Virol* 1990;**71** (Pt 10):2377–84.
- 5 467 Adelman K, Salmon B, Baines JD. Herpes simplex virus DNA packaging sequences adopt
6 468 novel structures that are specifically recognized by a component of the cleavage and
7 469 packaging machinery. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2001;**98**:3086–91.
- 8 470 Baker ML, Jiang W, Rixon FJ *et al*. Common ancestry of herpesviruses and tailed DNA
9 471 bacteriophages. *J Virol* 2005;**79**:14967–70.
- 10 472 Beard PM, Taus NS, Baines JD. DNA cleavage and packaging proteins encoded by genes
11 473 U(L)28, U(L)15, and U(L)33 of herpes simplex virus type 1 form a complex in infected cells.
12 474 *J Virol* 2002;**76**:4785–91.
- 13 475 Becker A, Murialdo H. Bacteriophage lambda DNA: the beginning of the end. *J Bacteriol*
14 476 1990;**172**:2819–24.
- 15 477 Bhattacharyya SP, Rao VB. Structural analysis of DNA cleaved in vivo by bacteriophage T4
16 478 terminase. *Gene* 1994;**146**:67–72.
- 17 479 Bogner E, Radsak K, Stinski MF. The gene product of human cytomegalovirus open reading
18 480 frame UL56 binds the pac motif and has specific nuclease activity. *J Virol* 1998;**72**:2259–64.
- 19 481 Bogner E, Reschke M, Reis B *et al*. Identification of the gene product encoded by ORF UL56
20 482 of the human cytomegalovirus genome. *Virology* 1993;**196**:290–3.
- 21 483 Borst EM, Bauerfeind R, Binz A *et al*. The Essential Human Cytomegalovirus Proteins
22 484 pUL77 and pUL93 are Structural Components Necessary for Viral Genome Encapsidation. *J*
23 485 *Virol* 2016, DOI: 10.1128/JVI.00384-16.
- 24 486 Borst EM, Kleine-Albers J, Gabaev I *et al*. The human cytomegalovirus UL51 protein is
25 487 essential for viral genome cleavage-packaging and interacts with the terminase subunits
26 488 pUL56 and pUL89. *J Virol* 2013;**87**:1720–32.
- 27 489 Borst EM, Wagner K, Binz A *et al*. The essential human cytomegalovirus gene UL52 is
28 490 required for cleavage-packaging of the viral genome. *J Virol* 2008;**82**:2065–78.
- 29 491 Chaer F El, Shah DP, Chemaly RF. How I treat resistant cytomegalovirus infection in
30 492 hematopoietic cell transplantation recipients. *Blood* 2016;**128**:2624–36.
- 31 493 Champier G, Couvreur A, Hantz S *et al*. Putative functional domains of human
32 494 cytomegalovirus pUL56 involved in dimerization and benzimidazole D-ribonucleoside
33 495 activity. *Antivir Ther* 2008;**13**:643–54.
- 34 496 Champier G, Hantz S, Couvreur A *et al*. New functional domains of human cytomegalovirus
35 497 pUL89 predicted by sequence analysis and three-dimensional modelling of the catalytic site
36 498 DEXDc. *Antivir Ther* 2007;**12**:217–32.
- 37 499 Chang YE, Poon AP, Roizman B. Properties of the protein encoded by the UL32 open
38 500 reading frame of herpes simplex virus 1. *J Virol* 1996;**70**:3938–46.
- 39 501 Chemaly RF, Ullmann AJ, Stoelben S *et al*. Letermovir for cytomegalovirus prophylaxis in
40 502 hematopoietic-cell transplantation. *N Engl J Med* 2014;**370**:1781–9.
- 41 503 Chou S. Approach to drug-resistant cytomegalovirus in transplant recipients. *Curr Opin Infect*
42 504 *Dis* 2015a;**28**:293–9.
- 43 505 Chou S. Rapid In Vitro Evolution of Human Cytomegalovirus UL56 Mutations That Confer
44 506 Letermovir Resistance. *Antimicrob Agents Chemother* 2015b;**59**:6588–93.
- 45 507 Couvreur A, Hantz S, Marquant R *et al*. Insight into the structure of the pUL89 C-terminal
46 508 domain of the human cytomegalovirus terminase complex. *Proteins* 2010;**78**:1520–30.
- 47 509 Dasgupta A, Wilson DW. ATP depletion blocks herpes simplex virus DNA packaging and
48 510 capsid maturation. *J Virol* 1999;**73**:2006–15.
- 49 511 Davison AJ. Channel catfish virus: a new type of herpesvirus. *Virology* 1992;**186**:9–14.
- 50 512 DeRussy BM, Boland MT, Tandon R. Human Cytomegalovirus pUL93 Links Nucleocapsid
51 513 Maturation and Nuclear Egress. *J Virol* 2016, DOI: 10.1128/JVI.00728-16.
- 52 514 DeRussy BM, Tandon R. Human cytomegalovirus pUL93 is required for viral genome
53
54
55
56
57
58
59
60

- 1
2
3 515 cleavage and packaging. *J Virol* 2015, DOI: 10.1128/JVI.02382-15.
- 4 516 Dittmer A, Drach JC, Townsend LB *et al.* Interaction of the putative human cytomegalovirus
5 517 portal protein pUL104 with the large terminase subunit pUL56 and its inhibition by
6 518 benzimidazole-D-ribonucleosides. *J Virol* 2005;**79**:14660–7.
- 7 519 Giesen K, Radsak K, Bogner E. The potential terminase subunit of human cytomegalovirus,
8 520 pUL56, is translocated into the nucleus by its own nuclear localization signal and interacts
9 521 with importin alpha. *J Gen Virol* 2000;**81**:2231–44.
- 10 522 Goldner T, Hempel C, Ruebsamen-Schaeff H *et al.* Geno- and phenotypic characterization of
11 523 human cytomegalovirus mutants selected in vitro after letermovir (AIC246) exposure.
12 524 *Antimicrob Agents Chemother* 2014a;**58**:610–3.
- 13 525 Goldner T, Hewlett G, Ettischer N *et al.* The novel anticytomegalovirus compound AIC246
14 526 (Letermovir) inhibits human cytomegalovirus replication through a specific antiviral
15 527 mechanism that involves the viral terminase. *J Virol* 2011a;**85**:10884–93.
- 16 528 Guo P, Peterson C, Anderson D. Prohead and DNA-gp3-dependent ATPase activity of the
17 529 DNA packaging protein gp16 of bacteriophage phi 29. *J Mol Biol* 1987;**197**:229–36.
- 18 530 Hwang J-S, Bogner E. ATPase activity of the terminase subunit pUL56 of human
19 531 cytomegalovirus. *J Biol Chem* 2002;**277**:6943–8.
- 20 532 Köppen-Rung P, Dittmer A, Bogner E. Intracellular distributions of capsid-associated pUL77
21 533 of HCMV and interactions with packaging proteins and pUL93. *J Virol* 2016, DOI:
22 534 10.1128/JVI.00351-16.
- 23 535 Kropweit D, McCormick D, Erb-Zohar K *et al.* Pharmacokinetics and safety of the anti-human
24 536 cytomegalovirus drug letermovir in subjects with hepatic impairment. *Br J Clin Pharmacol*
25 537 2017a, DOI: 10.1111/bcp.13376.
- 26 538 Kropweit D, Scheuenpflug J, Erb-Zohar K *et al.* Pharmacokinetics and safety of letermovir, a
27 539 novel anti-human cytomegalovirus drug, in patients with renal impairment. *Br J Clin*
28 540 *Pharmacol* 2017b, DOI: 10.1111/bcp.13292.
- 29 541 Krosky PM, Underwood MR, Turk SR *et al.* Resistance of human cytomegalovirus to
30 542 benzimidazole ribonucleosides maps to two open reading frames: UL89 and UL56. *J Virol*
31 543 1998;**72**:4721–8.
- 32 544 Leffers G, Rao VB. Biochemical characterization of an ATPase activity associated with the
33 545 large packaging subunit gp17 from bacteriophage T4. *J Biol Chem* 2000;**275**:37127–36.
- 34 546 Lischka P, Hewlett G, Wunberg T *et al.* In vitro and in vivo activities of the novel
35 547 anticytomegalovirus compound AIC246. *Antimicrob Agents Chemother* 2010a;**54**:1290–7.
- 36 548 Lischka P, Michel D, Zimmermann H. Characterization of Cytomegalovirus Breakthrough
37 549 Events in a Phase 2 Prophylaxis Trial of Letermovir (AIC246, MK 8228). *J Infect Dis*
38 550 2016;**213**:23–30.
- 39 551 Lischka P, Zhang D, Holder D *et al.* Impact of glycoprotein B genotype and naturally
40 552 occurring ORF UL56 polymorphisms upon susceptibility of clinical human cytomegalovirus
41 553 isolates to letermovir. *Antiviral Res* 2016;**132**:204–9.
- 42 554 Lurain NS, Chou S. Antiviral drug resistance of human cytomegalovirus. *Clin Microbiol Rev*
43 555 2010;**23**:689–712.
- 44 556 Marschall M, Stamminger T, Urban A *et al.* In vitro evaluation of the activities of the novel
45 557 anticytomegalovirus compound AIC246 (letermovir) against herpesviruses and other human
46 558 pathogenic viruses. *Antimicrob Agents Chemother* 2012;**56**:1135–7.
- 47 559 McNab AR, Desai P, Person S *et al.* The product of the herpes simplex virus type 1 UL25
48 560 gene is required for encapsidation but not for cleavage of replicated viral DNA. *J Virol*
49 561 1998;**72**:1060–70.
- 50 562 McVoy MA, Adler SP. Human cytomegalovirus DNA replicates after early circularization by
51 563 concatemer formation, and inversion occurs within the concatemer. *J Virol* 1994;**68**:1040–51.
- 52 564 Mitchell MS, Matsuzaki S, Imai S *et al.* Sequence analysis of bacteriophage T4 DNA

- 1
2
3 565 packaging/terminase genes 16 and 17 reveals a common ATPase center in the large subunit of
4 566 viral terminases. *Nucleic Acids Res* 2002;**30**:4009–21.
- 5 567 Morita M, Tasaka M, Fujisawa H. Structural and functional domains of the large subunit of
6 568 the bacteriophage T3 DNA packaging enzyme: importance of the C-terminal region in
7 569 prohead binding. *J Mol Biol* 1995;**245**:635–44.
- 8 570 Nadal M, Mas PJ, Blanco AG *et al*. Structure and inhibition of herpesvirus DNA packaging
9 571 terminase nuclease domain. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2010;**107**:16078–83.
- 10 572 Neuber S, Wagner K, Goldne T *et al*. Mutual Interplay between the Human Cytomegalovirus
11 573 Terminase Subunits pUL51, pUL56, and pUL89 promotes Terminase Complex Formation. *J*
12 574 *Virol* 2017, DOI: 10.1128/JVI.02384-16.
- 13 575 Przech AJ, Yu D, Weller SK. Point mutations in exon I of the herpes simplex virus putative
14 576 terminase subunit, UL15, indicate that the most conserved residues are essential for cleavage
15 577 and packaging. *J Virol* 2003;**77**:9613–21.
- 16 578 Rao VB, Feiss M. Mechanisms of DNA Packaging by Large Double-Stranded DNA Viruses.
17 579 *Annu Rev Virol* 2015;**2**:351–78.
- 18 580 Reefschlaeger J, Bender W, Hallenberger S *et al*. Novel non-nucleoside inhibitors of
19 581 cytomegaloviruses (BAY 38-4766): in vitro and in vivo antiviral activity and mechanism of
20 582 action. *J Antimicrob Chemother* 2001;**48**:757–67.
- 21 583 Sankhala RS, Lokareddy RK, Cingolani G. Divergent Evolution of Nuclear Localization
22 584 Signal Sequences in Herpesvirus Terminase Subunits. *J Biol Chem* 2016;**291**:11420–33.
- 23 585 Savva CGW, Holzenburg A, Bogner E. Insights into the structure of human cytomegalovirus
24 586 large terminase subunit pUL56. *FEBS Lett* 2004;**563**:135–40.
- 25 587 Scheffczik H, Savva CGW, Holzenburg A *et al*. The terminase subunits pUL56 and pUL89 of
26 588 human cytomegalovirus are DNA-metabolizing proteins with toroidal structure. *Nucleic Acids*
27 589 *Res* 2002;**30**:1695–703.
- 28 590 Scholz B, Rechter S, Drach JC *et al*. Identification of the ATP-binding site in the terminase
29 591 subunit pUL56 of human cytomegalovirus. *Nucleic Acids Res* 2003;**31**:1426–33.
- 30 592 Thoma C, Borst E, Messerle M *et al*. Identification of the interaction domain of the small
31 593 terminase subunit pUL89 with the large subunit pUL56 of human cytomegalovirus.
32 594 *Biochemistry (Mosc)* 2006;**45**:8855–63.
- 33 595 Toropova K, Huffman JB, Homa FL *et al*. The herpes simplex virus 1 UL17 protein is the
34 596 second constituent of the capsid vertex-specific component required for DNA packaging and
35 597 retention. *J Virol* 2011;**85**:7513–22.
- 36 598 Torres-Madriz G, Boucher HW. Immunocompromised hosts: perspectives in the treatment
37 599 and prophylaxis of cytomegalovirus disease in solid-organ transplant recipients. *Clin Infect*
38 600 *Dis Off Publ Infect Dis Soc Am* 2008;**47**:702–11.
- 39 601 Underwood MR, Harvey RJ, Stanat SC *et al*. Inhibition of human cytomegalovirus DNA
40 602 maturation by a benzimidazole ribonucleoside is mediated through the UL89 gene product. *J*
41 603 *Virol* 1998;**72**:717–25.
- 42 604 Wang JB, McVoy MA. A 128-base-pair sequence containing the pac1 and a presumed cryptic
43 605 pac2 sequence includes cis elements sufficient to mediate efficient genome maturation of
44 606 human cytomegalovirus. *J Virol* 2011;**85**:4432–9.
- 45 607 Wang JB, Zhu Y, McVoy MA *et al*. Changes in subcellular localization reveal interactions
46 608 between human cytomegalovirus terminase subunits. *Virol J* 2012;**9**:315.
- 47 609 Wang Y, Mao L, Kankanala J *et al*. Inhibition of Human Cytomegalovirus pUL89 Terminase
48 610 Subunit Blocks Virus Replication and Genome Cleavage. *J Virol* 2016, DOI:
49 611 10.1128/JVI.02152-16.
- 50 612 White CA, Stow ND, Patel AH *et al*. Herpes simplex virus type 1 portal protein UL6 interacts
51 613 with the putative terminase subunits UL15 and UL28. *J Virol* 2003;**77**:6351–8.
- 52 614 Wildum S, Zimmermann H, Lischka P. In vitro drug combination studies of Letemovir

1
2
3 615 (AIC246, MK-8228) with approved anti-human cytomegalovirus (HCMV) and anti-HIV
4 616 compounds in inhibition of HCMV and HIV replication. *Antimicrob Agents Chemother*
5 617 2015;**59**:3140–8.
6 618 Williams SL, Hartline CB, Kushner NL *et al.* In vitro activities of benzimidazole D- and L-
7 619 ribonucleosides against herpesviruses. *Antimicrob Agents Chemother* 2003;**47**:2186–92.
8
9 620

10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60

For Peer Review

1
2
3
4
5 **Figure 1. From full genome to cleavage site.** Rolling circle replication results in the
6 formation of head-to-tail concatamers that further act as substrates for the encapsidation
7 process. The genome is organised as two regions. The unique long (UL) and the unique short
8 (US) segments are flanked by repeated sequences which contain the « a » sequence. The pac1
9 and pac2 sequences are present in each « a » sequence.
10
11
12
13
14
15
16
17

18 **Figure 2. Cleavage/packaging and the HCMV terminase complexe adapted from**
19 **Bogner, Radsak and Stinski 1998.** 1) Translocation of the terminase complex into the
20 nucleus 2) HCMV terminase specifically binds the pac site and recruits the empty capsid, 3)
21 cleaves the duplex, 4) exerts its ATPase activity to power translocation of a unit-length DNA
22 genome into the capsid and 5) completes the packaging process by cutting off excess DNA at
23 the portal region. 6) Finally, the DNA/terminase complex dissociates from the filled capsid
24 and is ready for next packaging step.
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35

36 **Figure 3. Terminase subunit pUL56 conserved regions adapted from Champier *et al.*,**
37 **2008.** pUL56 is composed of 12 conserved regions (I-XII). The conserved region IV
38 represents the pUL56 zinc-finger domain. The central region of pUL56 and the C-terminus
39 include two variable regions annotated VRI and VR II. The three putative leucine zippers,
40 annotated pUL56-LZ, are indicated. Positions of amino acids associated with in vitro
41 resistance to letermovir are highlighted. The position of the Q204R benzimidazole resistance
42 mutation is shown in grey.
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53

54 **Figure 4. Terminase subunit pUL89 conserved regions adapted from Champier *et al.*,**
55 **2007.** pUL89 is composed of 12 conserved region (I-XII) with several putative functional
56
57
58
59
60

1
2
3 domains such as nuclear localization site (NLS-1 and NLS-2), pUL89 zinc-finger domain
4
5 annotated pUL89-ZF, adenine binding site (Walker A box, Walker B box and ATPase
6
7 coupling helicase, ATP binding site. Underlined amino acids are residues involved in the
8
9 activities of domains.
10

11
12
13
14 **Figure 5. Sequences alignment of pUL56 conserved region VI (boxed) from 21**
15 **herpesviruses (Champier *et al.*, 2008).** Sequence numbering is consistent with that of the
16 **AD169 residues. HCMV residues involved in letermovir resistance are shown as white letters**
17 **on a black background. Residues of alpha-, beta-, and gammaherpesviruses tested with**
18 **letermovir (Marshall *et al.*, 2012) are shown as black letters on a grey background.**
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60

1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60

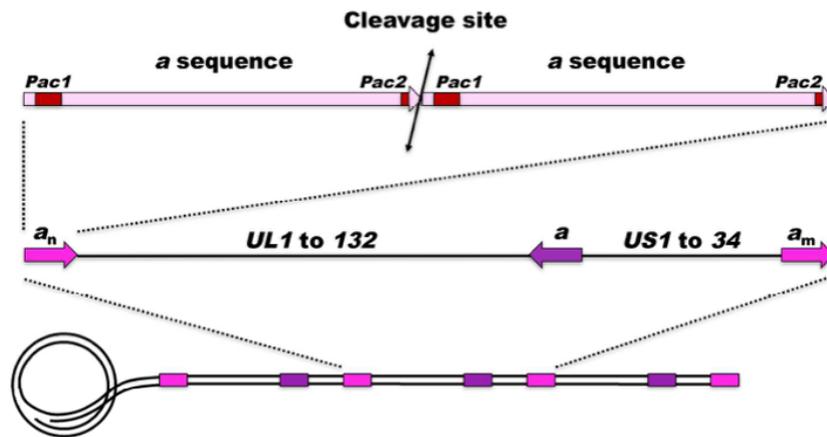


Figure 1. From full genome to cleavage site. Rolling circle replication results in the formation of head-to-tail concatamers that further act as substrates for the encapsidation process. The genome is organised as two regions. The unique long (UL) and the unique short (US) segments are flanked by repeated sequences which contain the « a » sequence. The pac1 and pac2 sequences are present in each « a » sequence.

254x190mm (290 x 290 DPI)

1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60

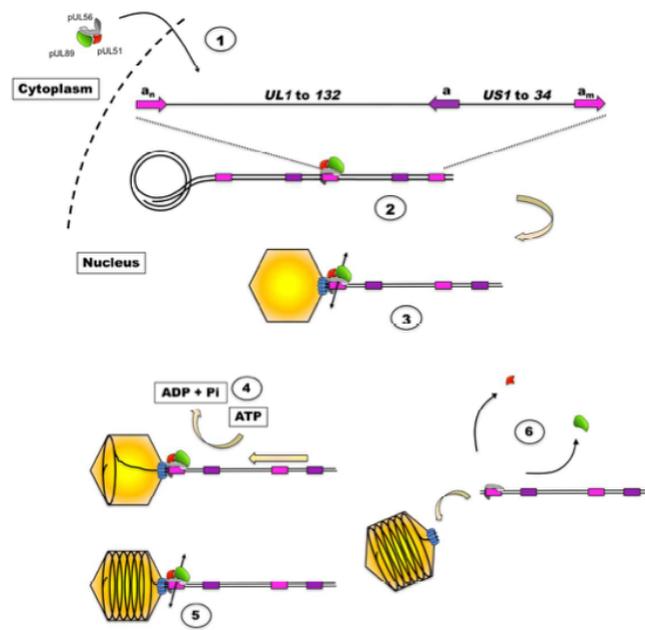
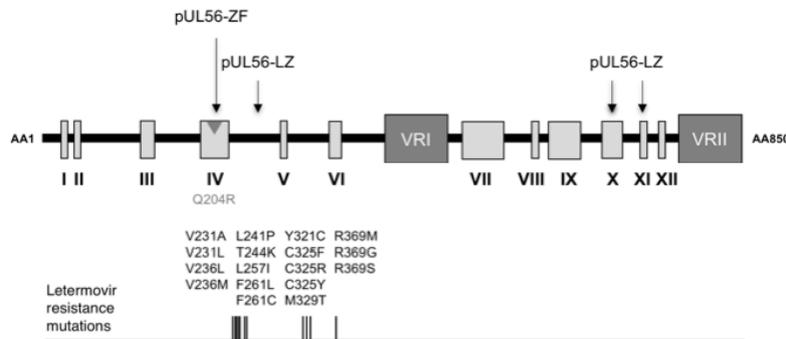


Figure 2. Cleavage/packaging and the HCMV terminase complex adapted from Bogner, Radsak and Stinski 1998. 1) Translocation of the terminase complex into the nucleus 2) HCMV terminase specifically binds the pac site and recruits the empty capsid, 3) cleaves the duplex, 4) exerts its ATPase activity to power translocation of a unit-length DNA genome into the capsid and 5) completes the packaging process by cutting off excess DNA at the portal region. 6) Finally, the DNA/terminase complex dissociates from the filled capsid and is ready for next packaging step.

230x180mm (290 x 290 DPI)

1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60



Conserved regions localization for HCMV pUL56:

I - M21-P31	IV - C191-I220	VII - E514-R572	X - Y676-F713
II - F41-Q62	V - Q272-W300	VIII - Y590-L600	XI - V732-F744
III - L134-E141	VI - E356-I374	IX - I617-L658	XII - D755-L764

Variable regions localization for HCMV pUL56:

VRI - A425-E485 VRII - V778-R850

Figure 3. Terminase subunit pUL56 conserved regions adapted from Champier et al., 2008. pUL56 is composed of 12 conserved regions (I-XII). The conserved region IV represents the pUL56 zinc-finger domain. The central region of pUL56 and the C-terminus include two variable regions annotated VRI and VRII. The three putative leucine zippers, annotated pUL56-LZ, are indicated. Positions of amino acids associated with in vitro resistance to letermovir are highlighted. The position of the Q204R benzimidazole resistance mutation is shown in grey.

208x163mm (290 x 290 DPI)

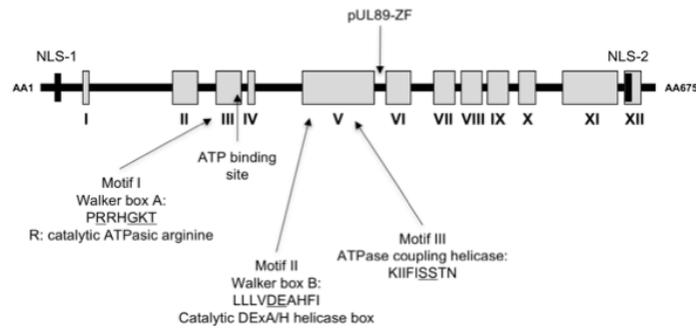
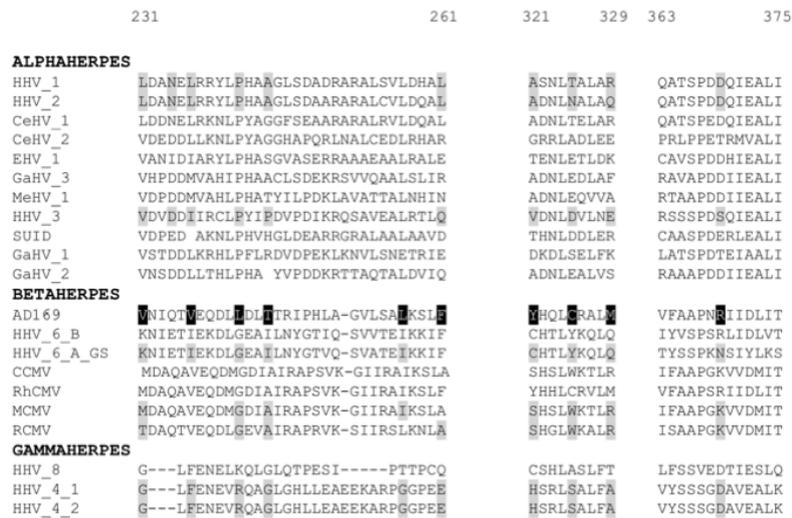


Figure 4. Terminase subunit pUL89 conserved regions adapted from Champier et al., 2007. pUL89 is composed of 12 conserved region (I-XII) with several putative functional domains such as nuclear localization site (NLS-1 and NLS-2), pUL89 zinc-finger domain annotated pUL89-ZF, adenine binding site (Walker A box, Walker B box and ATPase coupling helicase, ATP binding site. Underlined amino acids are residues involved in the activities of domains.

236x133mm (290 x 290 DPI)

1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60



Region VI - E356-I374

Figure 5. Sequences alignment of pUL56 conserved region VI (boxed) from 21 herpesviruses (Champier et al., 2008). Sequence numbering is consistent with that of the AD169 residues. HCMV residues involved in letermovir resistance are shown as white letters on a black background. Residues of alpha-, beta-, and gammaherpesviruses tested with letermovir (Marshall et al., 2012) are shown as black letters on a grey background.

173x118mm (290 x 290 DPI)

Table I: Overview of terminases homologs of herpesviruses and phages

Function	Homologs														
	HCMV			HSV			Phage λ			Phage T4			Phage T3/T7		
	Name	Mass (kDa)	References	Name	Mass (kDa)	References	Name	Mass (kDa)	References	Name	Mass (kDa)	References	Name	Mass (kDa)	References
Large terminase subunit binds to DNA pac motifs	UL56	130	(Schefferik <i>et al.</i> 2002), (Bogner <i>et al.</i> 1993)	UL28	85	(Addison, Rixon and Preston 1990), (Togehsen <i>et al.</i> 1993)	gpNul	20	(Becker and Marialdo 1990)	gp16	18	(Bhattacharyya and Rao 1994)	gp18	20	(Morita, Tsuboi and Fujisawa 1995)
Small ATPase subunit of terminase	UL89	75	(Chamrier <i>et al.</i> 2007), (Couvreur <i>et al.</i> 2010)	UL15	81	(Ya and Weller 1998), (Przech, Yu and Weller 2003)	gpA	73	(Becker and Marialdo 1990)	gp17	70	(Bhattacharyya and Rao 1994)	gp19	67	(Morita, Tsuboi and Fujisawa 1995)
DNA-packaging	UL51	17	(Borst <i>et al.</i> 2013)	UL33	36	(Beard, Tans and Baines 2002)	NA			NA			NA		
Interacts with terminase	UL52	76	(Borst <i>et al.</i> 2008)	UL32	150	(Chang, Poon and Roizman 1996)	NA			NA			NA		
Interacts with terminase	UL77	100	(Köppen-Rung, Dittmer and Bogner 2016), (Borst <i>et al.</i> 2016)	UL25	60	(McNab <i>et al.</i> 1998)	NA			NA			NA		
Interacts with terminase	UL93	70	(Köppen-Rung, Dittmer and Bogner 2016), (Borst <i>et al.</i> 2016)	UL17	20	(Toropova <i>et al.</i> 2011)	NA			NA			NA		

NA: not available

Table II: Antiviral activity of letermovir against alpha-, beta-, and gammaherpesviruses adapted from Marshall *et al.*, 2012

Virus (strain)	AIC246 EC ₅₀ ± SD (µM) ^a
Alphaherpesviruses	
VZV (Oka)	>10
HHV_1 (166v VP22-GFP)	>10
HHV_2 (01-6332)	>10
Betaherpesviruses	
HCMV (AD169-GFP)	0,0027 ± 0,0002
MCMV (Smith)	4,5 ± 2,0
RCMV (Maastricht)	>10
HHV_6 (A-GS)	>10
Gammaherpesviruses	
EBV (B95-8)	>10

^a EC₅₀ values were determined by specific cell culture-based antiviral test systems. Data are means of results from at least three independent experiments and are expressed with standard deviations.

Table S1: Sequences used for alignment of pUL56 and homologues.

Identification	Sequence identification	Accession number	Reference
HSV_1	Human herpesvirus type 1 pUL28 packaging protein	CAA32321	Dolan <i>et al.</i> , 1992
HSV_2	Human herpesvirus type 2 pUL28 packaging protein	CAB0675	Barnett <i>et al.</i> , 1992
CeHV_1	Cercopithecine herpesvirus 1 pUL28	BAC58068	Pelyrigina <i>et al.</i> , 2003
CeHV_2	Cercopithecine herpesvirus 2 pUL28	AAU84532	Tyler, Peters, and Severini, 2005
EHV_1	Equine herpesvirus 1 ORF32	YP_053077	Telford <i>et al.</i> , 1992
GaHV_3	Gallid herpesvirus 3 pUL28	BAB16538	Izumiya <i>et al.</i> , 2001
MeHV_1	Meleagrid herpesvirus 1 pUL28 processing and transport protein	AAG30068	Kingham <i>et al.</i> , 2001
HHV_3	Human herpesvirus 3 (Varicella-Zoster virus)	CAA27913	Davison and Scott, 1986
SUID	Suid herpesvirus 1 (Pseudorabies virus) UL28	YP_068331	Klupp <i>et al.</i> , 2004
GaHV_1	Gallid herpesvirus 1 UL28-like protein	YP_182357	Thureen <i>et al.</i> , 2006
GaHV_2	Gallid herpesvirus 2 Homologue of HSV 1 ICP 18.5 packaging protein	AAF66763	Kato <i>et al.</i> , 1999
AD169	Human cytomegalovirus AD169 strain pUL56	X17403	Chee <i>et al.</i> , 1990
HHV_6_B	Human herpesvirus 6 type B transport protein	Q9WT24	Isegawa <i>et al.</i> , 1999
HHV_6_A_GS	Human herpesvirus 6 type A transport protein	AHK06969	None
CCMV	Chimpanzee herpesvirus pUL56	AF480884	Davison <i>et al.</i> , 2003
RhCMV	Cercopithecine herpesvirus 8 (Rhesus cytomegalovirus) putative pUL56 DNA packaging protein	AAZ80592	None
MCMV	Murid herpesvirus 1 (Murine cytomegalovirus) major DNA-binding protein	CAA47415	Messerle <i>et al.</i> , 1992
RCMV	Murid herpesvirus 2 (Rat cytomegalovirus Maastricht) pR56 protein	AAC56431	Beuken <i>et al.</i> , 1996
HHV_8	Human herpesvirus 8 BALF3 EBV homolog, transport protein homologue	AAC57084	Moore <i>et al.</i> , 1996
HHV_4_1	Human herpesvirus 4 type 1 BALF3	YP_401715	de Jesus <i>et al.</i> , 2003
HHV_4_2	Human herpesvirus 4 type 2 BALF3	YP001129509	Dolan <i>et al.</i> , 2006

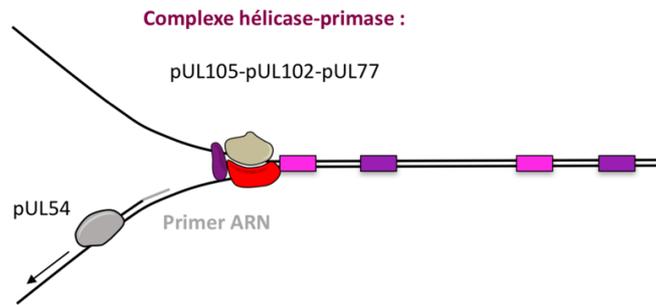


Figure 18 : Place du complexe hélicase-primase dans le mécanisme de réplication virale. Le complexe hélicase-primase du CMVH est un hétéro-oligomère composé des protéines pUL70, pUL102 et pUL105. Ce complexe catalyse l'ouverture de l'ADN double brin, permettant à la polymérase de synthétiser le brin complémentaire.

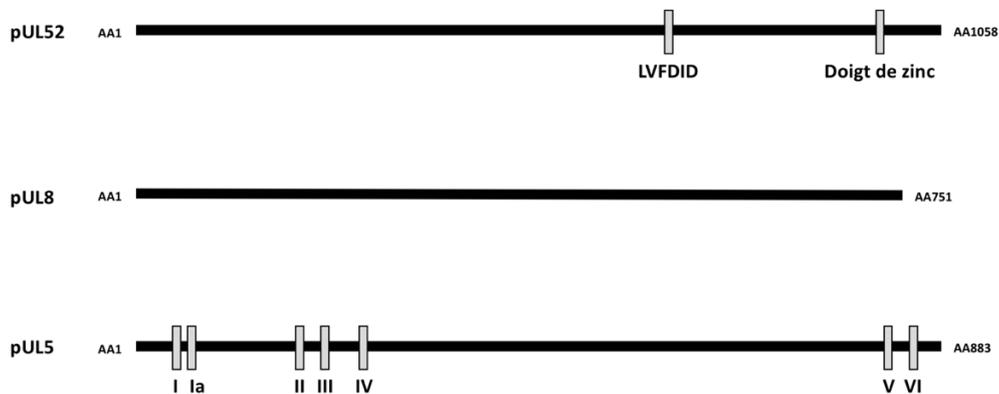


Figure 19 : Structure des trois sous-unités du complexe hélicase-primase de l'HSV-1 (pUL52, pUL8 et pUL5). Adapté de Weller and Kuchta, 2013. Deux domaines conservés de la primase (pUL52) sont indiqués : Le domaine catalytique LVFDID (résidus 608 à 630) et le domaine doigt de zinc hypothétique (résidus 998 à 1028). pUL8 est une protéine de 751 acides aminés ne possédant pas de domaines fonctionnel connus. Les domaines conservés I à VI de l'hélicase (pUL5) sont indiqués.

EXPLORATION DU COMPLEXE HELICASE-PRIMASE

Comme pour les autres herpès virus humain, les sous-unités du complexe hélicase-primase du CMVH apparaissent comme des cibles antivirales potentielles. Ainsi, ce chapitre du manuscrit s'intéresse aux connaissances structurales et fonctionnelles des protéines du complexe hélicase-primase du CMVH.

Le complexe hélicase-primase des herpès virus correspond à une famille de protéines nécessaires à l'ouverture de la fourche lors du processus de réplication par l'activité hélicase et à la synthèse du brin d'ADN retardé par l'activité primase (**Figure 18**).

Ce complexe est hautement conservé. Néanmoins, les connaissances structurales et fonctionnelles sont différentes en fonction des sous-familles des herpès virus. En effet, peu de connaissances sont actuellement disponibles sur les protéines du complexe du CMVH. Néanmoins, par homologie de séquence, d'hypothétiques motifs au sein des sous-unités du complexe hélicase-primase ont été identifiés (**Woon et al., 2008**). La fonction des protéines a été rapportée par homologie à celle de l'HSV-1 (pUL52, pUL8 et pUL5).

La sous-unité pUL52 (primase) de l'HSV-1 contient deux régions conservées retrouvées chez d'autres primases, un domaine putatif de liaison à l'ADN (motif doigt de zinc) (**Biswas and Weller, 1999**) (**Chen et al., 2007**) et un motif DxD nécessaire à l'activité catalytique (**Klinedinst and Challberg, 1994**) (**Dracheva et al., 1995**). La sous-unité pUL8 (facteur associé) ne possède pas de fonction catalytique connue, mais peut faciliter la translocation nucléaire du complexe et moduler ses fonctions enzymatiques (**Tenney et al., 1994**) (**Barnard et al., 1997**) (**Falkenberg et al., 1997**). La sous-unité pUL5 (hélicase) contient sept domaines conservés essentiels pour la synthèse d'ADN et par conséquent la réplication virale (**Zhu and Weller, 1988**) (**Zhu and Weller, 1992**) (**Graves-Woodward et al., 1997**) (**Figure 19**).

La primase du CMVH ou pUL70 est une protéine de 946 acides aminés. Le segment C-terminal, le plus variable de la protéine, contient de potentiels motifs fonctionnels. Les données sur la primase proviennent des résultats obtenus sur la primase pUL52 de l'HSV-1. On retrouve notamment un hypothétique doigt de zinc (résidus 881-920), un hypothétique motif DxD (résidus 517-519), les motifs doigt de zinc étant connus pour être impliqués dans la reconnaissance de l'ADN et les interactions protéines-protéines. Le motif DxD, conservé chez

28 homologues, est essentiel à la fonction de la primase de l'HSV (**Dracheva et al., 1995**). On retrouve aussi un motif CxC (631-633). Par ailleurs, pUL70 possède de nombreux sites de phosphorylation CKII (**Tableau III**) (**Woon et al., 2008**).

Le gène *UL102* code le facteur associé du CMVH ou pUL102 de 875 acides aminés (**Woon et al., 2008**). pUL102 contient une région riche en glycine et une petite région riche en sérine (résidus 795-836) qui pourrait être importante pour les processus de phosphorylation de pUL102. Un domaine putatif de fixation de l'intégrine a été identifié. Enfin, pUL102 contient huit putatifs sites de phosphorylation CKII probablement importants pour l'activation de ce facteur (**Tableau III**).

Les hélicases constituent une grande famille de protéines à activité ATPase catalysant l'ouverture d'acides nucléiques bicaténaux. L'hélicase du CMVH ou pUL105 est une protéine de 956 acides aminés dont la fonction a été attribuée par homologie avec l'hélicase de l'HSV-1. Elle comporte six motifs putatifs (I à VI), caractéristiques des hélicases, hautement conservés au sein d'isolats et de trente-deux homologues. Le motif I pourrait être impliqué dans la fixation de l'ATP, alors que le motif II pourrait permettre la chélation d'ions Mg^{2+} (respectivement motifs « *Walker A* » et « *Walker B* ») (**Walker et al., 1982**). Les alignements protéiques ont aussi permis d'identifier quinze sites hypothétiques de phosphorylation. Deux sites putatifs de N-glycosylation ont aussi été identifiés au niveau des résidus 25 et 398 et pourraient être essentiels à la structuration de la sous-unité hélicase (**Tableau III**) (**Woon et al., 2008**).

Malgré ces études *in silico* mettant en évidence la présence d'hypothétiques motifs fonctionnels, aucune donnée expérimentale n'est disponible à ce jour pour conforter ces hypothèses. Différents travaux ont récemment conduit à l'émergence de nouvelles classes thérapeutiques inhibant le complexe hélicase-primase de l'HSV-1 et -2. Ainsi, deux molécules, le pritelevir et l'amenamevir, sont efficaces dans le traitement de l'herpès simplex humain de type 1 et 2 (**Chono et al., 2010**) (**Wald et al., 2014**). Néanmoins, ces molécules ne présentent aucune activité contre le CMVH (**Dropulic and Cohen, 2010**). Devant le développement de ces molécules, le complexe hélicase-primase du CMVH pourrait aussi devenir une cible antivirale de choix dans le traitement de l'infection à CMVH.

Tableau III : Motifs putatifs identifiés dans les gènes du complexe hélicase-primase du CMVH. Adapté de Woon et al., 2008.

Motif	Gene		
	<i>UL70</i>	<i>UL102</i>	<i>UL105</i>
N-linked glycosylation site	3	1	9
cAMP-dependent protein kinase phosphorylation site	1	0	2
Casein kinase II phosphorylation site	20	8	15
Protein kinase C phosphorylation site	10	7	10
Amidation site	1	0	0
N-myristoylation site	5	22	11
Tyrosine kinase phosphorylation site	2	2	2
Cell attachment sequence	0	1	0
ATP/GTP-binding site motif A (P-loop)	0	0	1
Zn finger	1	0	0
DxD	1	0	0
CxC	1	0	0

OBJECTIF DE L'ETUDE

Le CMVH représente donc un problème majeur de santé publique. En effet, le CMVH est un pathogène opportuniste chez les sujets immunodéprimés et il représente aussi la principale cause d'infection congénitale d'origine virale. Les antiviraux conventionnels ciblent la polymérase virale et leur utilisation est limitée par leur toxicité. Depuis plusieurs années, il a été démontré que les traitements prolongés, notamment ceux ciblant la polymérase virale pUL54 du CMVH, favorisaient l'émergence de mutations de résistance. Par ailleurs, de par leur toxicité, ces molécules sont contre-indiquées pendant la grossesse.

Dans ce contexte, la première partie de notre travail a porté sur la **caractérisation de mutations de la polymérase virale pUL54 et de la kinase virale pUL97** associées à l'émergence de résistance clinique chez des patients dont les prélèvements ont été adressés pour une recherche de résistance au Centre National de Référence du Cytomégalo virus.

Devant l'émergence de mutations de résistance et la toxicité des molécules utilisées en clinique, la nécessité de développer de nouvelles thérapies ciblant d'autres étapes de la réplication virale apparaît comme un enjeu majeur.

Les protéines du complexe terminase apparaissent comme une cible virale de choix, hautement conservées, sans homologue cellulaire. Le récent développement du letermovir ciblant la sous-unité pUL56 vient conforter ce choix. Cependant, à ce jour, la relation structure-fonction des protéines du complexe est peu connue. Bien qu'ils constituent des cibles virales potentielles, les domaines fonctionnels impliqués dans la liaison à l'ADN, dans la dimérisation de pUL56, dans l'activité nucléase ou dans la formation du complexe sont encore inconnus,

De récentes études ont conduit à l'apparition de nouvelles classes thérapeutiques qui sont actuellement en développement clinique. Bien qu'efficaces contre l'HSV-1, l'HSV-2 et le VZV, ces molécules ne présentent aucune activité contre le CMVH. Cependant, le complexe hélicase-primase du CMVH pourrait aussi devenir une cible antivirale de choix dans le traitement de l'infection à CMVH

Ainsi, la deuxième partie de notre travail a porté sur l'étude de deux nouvelles cibles thérapeutiques ; le **complexe terminase** et le **complexe hélicase-primase** afin d'identifier des domaines fonctionnels importants pouvant devenir de potentielles cibles thérapeutiques.

ÉTUDE EXPERIMENTALE

ANALYSES DE MUTATIONS DE RESISTANCES

CARACTERISATION DE MUTATIONS DE RESISTANCE

Caractérisation de mutations de pUL54 : bénéfiques et limites d'une analyse à partir d'un modèle 3D

Une première partie du travail a consisté à caractériser de nouvelles mutations non décrites détectées chez des patients présentant une souche de CMVH ne répondant pas au traitement antiviral instauré. L'introduction de la mutation, par mutagénèse « *en passant* », dans un Chromosome Bactérien Artificiel (BAC) contenant le génome entier du CMVH nous permet, après transfection en fibroblastes humains, de tester la sensibilité de la souche aux antiviraux couramment utilisés en clinique et l'influence sur la capacité répliquative. Par une approche bio-informatique, la modélisation de pUL54, par homologie avec la polymérase de l'HSV, nous permet de visualiser l'impact de mutations sur la fonction des différents domaines fonctionnels et de prédire l'impact sur la fonction de la polymérase.

La mutation D515Y situé dans le domaine « *3'-5' exonucléase* » a induit une résistance de haut niveau au GCV et FOS (CI50 du BAC CMVH recombinant augmentée respectivement de 6,2 et 4,7 fois par rapport au BAC CMVH de type sauvage). La substitution V787A située dans le domaine catalytique VI induit un niveau de résistance élevé GCV et FOS (CI50 du BAC CMVH recombinant augmentée respectivement de 4,7 et 3,2 fois par rapport au BAC CMVH de type sauvage). Les courbes de croissance pour les deux souches mutées sont semblables à celles du BAC CMVH de type sauvage montrant que les mutations *UL54* D515Y et V787A n'ont aucun impact sur la capacité de réplication du CMVH.

L'approche tridimensionnelle déjà utilisée pour les études de sensibilité antivirale du VIH-1 et du VHC peut être très utile pour obtenir des informations sur l'impact de mutations sur la résistance à des antiviraux (Quashie et al., 2012) (Rimmert et al., 2014). L'équipe UMR 1092 a précédemment montré l'avantage de cartographier de nouvelles mutations dans la structure théorique de pUL54 (Hantz et al., 2013). En utilisant le modèle de pUL54, nous avons

localisé l'aspartate 515 dans le domaine « 3'-5' exonucléase ». Habituellement, la résistance induite par des substitutions dans cette région concerne à la fois le GCV et le CDV. En ce qui concerne le locus 515, le Y responsable de la résistance au GCV, est un acide aminé non polaire avec une chaîne latérale « imposante » suggérant que le mécanisme de résistance impliqué est lié à la taille. Le carbone alpha du résidu 515 est proche de l'un des ions Mg^{2+} constituant la poche catalytique du domaine « 3'-5' exonucléase ». Par conséquent, l'interaction électrostatique entre les ions Mg^{2+} et la chaîne latérale du résidu muté peut avoir une incidence sur les distances entre les résidus catalytiques D301 et E303 vers les ions Mg^{2+} . Il est également intéressant de souligner que D515Y constitue la cinquième mutation dans ce domaine à avoir été rapportée comme induisant une résistance au FOS (**Ducancelle et al., 2006**) (**Gilbert and Boivin, 2005a**) (**Gilbert et al., 2011**). Néanmoins, la résistance au FOS à cette position est moins évidente car le mécanisme d'action du FOS a lieu à l'interface entre les domaines « fingers » et « thumb » en « mimant » la queue polyphosphate du nucléoside (**Zahn et al., 2011**). Ainsi, la résistance aux FOS localisée dans le domaine « 3'-5' exonucléase » est plus difficile à expliquer.

Les substitutions d'un résidu aliphatique par un autre aliphatique, déjà caractérisées comme étant sensibles à différents antiviraux, appartiennent généralement aux domaines « palm » et « 3'-5' exonucléase ». Une analyse minutieuse révèle que les mutations impliquant le noyau du domaine « fingers » (fragments 781-787 et 809-812) sont l'emplacement de la résistance antivirale. Le noyau de ce domaine renferme des résidus critiques pour l'activité de la polymérase virale pUL54 (R784, R788, K811 et N815). Ainsi, un changement au centre du « leucine zipper » constituant ce domaine, comme la substitution V787A, pourrait altérer l'insertion de l'antivirale. Cependant, la substitution L501I (**Cihlar et al., 1998**) constitue une exception à cette règle et il est difficile d'en donner une explication.

Ainsi, pour analyser l'impact de nouvelles mutations de la polymérase du CMVH, nous pourrions suggérer une stratégie en deux étapes (modélisation 3D suivie d'une caractérisation phénotypique du virus recombinant) permettant un conseil plus rapide pour les cliniciens dans la pharmacorésistance du CMVH afin de proposer une adaptation du traitement. Le modèle d'homologie tridimensionnelle permet de localiser une mutation et de déterminer sa proximité avec le site catalytique de la protéine. Il permet d'identifier la probabilité de la participation

d'une mutation à la résistance. Au contraire, si la mutation se trouve dans une partie non ou peu structurée et à l'écart de la poche catalytique, le modèle 3D ne peut pas être utilisé avec une grande confiance. En outre, ce modèle ne permet pas de prédire l'impact des changements mineurs dans la séquence d'acides aminés, comme le montre la mutation L501I, qui, bien que très conservatrice, induit une résistance à la fois au GCV et au CDV (Erice, 1999). Cependant, quel que soit le résultat de la prédiction issue de la modélisation, le rôle de chaque nouveau mutant doit être confirmé par une caractérisation phénotypique du virus recombinant.

*La caractérisation de ces deux mutations de la polymérase virale pUL54 (D515Y et V787A) a fait l'objet d'un premier article paru dans « **Antiviral Research** » :*

Contrasting effect of new HCMV pUL54 mutations on antiviral drug susceptibility: benefits and limits of 3D analysis

**Andouard, D., Mazon, M-C., Ligat, G., Couvreur, A., Pouteil-Noble, Cahen, R.,
Yasdanpanah., Y., Deering, M., Viget, N., Alain, S., Hantz, S.**

(2016) Antiviral Res. 129, 115–119.

(Les données complémentaires de l'article sont données en annexes)

Accepted Manuscript

Contrasting effect of new HCMV pUL54 mutations on antiviral drug susceptibility:
Benefits and limits of 3D analysis

D. Andouard, M.-C. Mazon, G. Ligat, A. Couvreur, C. Pouteil-Noble, R. Cahen R, Y.
Yasdanpanah, M. Deering, N. Viget, S. Alain, S. Hantz



PII: S0166-3542(16)30036-5

DOI: [10.1016/j.antiviral.2016.02.004](https://doi.org/10.1016/j.antiviral.2016.02.004)

Reference: AVR 3767

To appear in: *Antiviral Research*

Received Date: 21 September 2015

Revised Date: 29 January 2016

Accepted Date: 1 February 2016

Please cite this article as: Andouard, D., Mazon, M.-C, Ligat, G., Couvreur, A., Pouteil-Noble, C., Cahen R, R., Yasdanpanah, Y., Deering, M., Viget, N., Alain, S., Hantz, S., Contrasting effect of new HCMV pUL54 mutations on antiviral drug susceptibility: Benefits and limits of 3D analysis, *Antiviral Research* (2016), doi: 10.1016/j.antiviral.2016.02.004.

This is a PDF file of an unedited manuscript that has been accepted for publication. As a service to our customers we are providing this early version of the manuscript. The manuscript will undergo copyediting, typesetting, and review of the resulting proof before it is published in its final form. Please note that during the production process errors may be discovered which could affect the content, and all legal disclaimers that apply to the journal pertain.

**Contrasting effect of new HCMV pUL54 mutations on antiviral drug susceptibility:
benefits and limits of 3D analysis**

D. Andouard^{1,2,3}, M-C Mazon⁴, G. Ligat^{1,2,3}, A. Couvreur^{1,2,3}, C. Pouteil-Noble⁵, R. Cahen
R, Y. Yasdanpanah⁶, M. Deering^{1,2,3}, N. Viget⁷, S. Alain^{1,2,3}, S. Hantz^{*1,2,3}

(1) Univ. Limoges, UMR 1092, Limoges, France.

(2) INSERM, UMR 1092, Limoges, France.

(3) CHU Limoges, Laboratoire de Bactériologie-Virologie-Hygiène, National Reference
Center for Cytomegaloviruses (NRC), Limoges, France

(4) CHU Saint Louis, Laboratoire de Bactériologie-Virologie, NRC-associated laboratory,
Paris, France

(5) CHU Lyon, Service de Transplantation rénale, Hôpital Edouard Herriot, Lyon, France

(6) CHU Bichat, Service de Maladies infectieuses et Tropicales, Paris, France

(7) Department of Infectious Diseases, Lille School of Medicine, Tourcoing Hospital,
Tourcoing, France

*Corresponding author:

Sébastien Hantz, National Reference Center for Cytomegaloviruses, CBRS, Hospital
Dupuytren, 2 avenue ML King, 87000 Limoges. sebastien.hantz@unilim.fr

ACCEPTED MANUSCRIPT

1 Human cytomegalovirus (HCMV) remains a cause of severe infections in
2 immunocompromised patients as allograft recipients of solid-organ (Beam and Razonable,
3 2012) or hematopoietic stem-cell transplant (Ariza-Heredia et al., 2014) and patients with
4 AIDS. To prevent and manage HCMV infection in those patients, antiviral treatments are
5 given in prophylaxis and/or treatment. All the currently available antiviral drugs, ganciclovir
6 (GCV) or valganciclovir (vGCV), foscarnet (FOS) and cidofovir (CDV) target the viral DNA
7 polymerase. In some patients, long-duration treatment or prophylaxis induce emergence of
8 drug resistance (Alain et al., 2004) (Hantz et al., 2010). Resistance to GCV results mainly
9 from mutations within the kinase *UL97* gene and less frequently from mutations in the DNA
10 polymerase *UL54* gene. FOS and CDV resistance-associated mutations are located in gene
11 *UL54* and mutations that confer cross-resistance to two or more drugs have been described.
12 (Hakki and Chou, 2011). Two new HCMV DNA polymerase *UL54* mutations, D515Y and
13 V787A, located in δ C/ExoIII domain and in the VI catalytic domain respectively were
14 detected in clinical strains from patients failing therapy. Those domains are known to be
15 essential to *UL54* function, and mutations located within them have been shown responsible
16 for resistance phenotype. Moreover, several mutations occurring at the same positions show
17 different levels of resistance. We thus aimed to measure the impact on drug resistance of
18 D515Y and V787A mutations through HCMV bacterial artificial chromosome (BAC)
19 mutagenesis, a method to get recombinant viruses to assess phenotypic characterization *in*
20 *vitro*.

21 D515Y was detected in a HCMV-seronegative kidney recipient with seropositive
22 donor included in a Prospective Multicentric Study of Cytomegalovirus Resistance in
23 Transplant Patients and Bone Marrow Recipients (NCT01008540) (Fig 1.A) (Hantz et al.,
24 2010). After loss of the first graft due to chronic rejection, she received a second kidney in
25 March 2007. In April, she underwent anal HSV reactivation treated with valaciclovir (1g/d)

ACCEPTED MANUSCRIPT

26 during 7 days (first exposition to antiviral). HCMV primary infection occurred 30 days after
27 transplantation. After 1 month of GCV followed by 3 weeks of vGCV, the viral load became
28 undetectable on June 11th. However 5 days after stopping vGCV, the viral load rose again and
29 GCV therapy had to be started again on July 13th. GCV dosage was increased from 300 mg/d
30 to 500 mg/d between July and November. During this period, immunosuppressive regimen
31 was reinforced due to impairment of renal function. In spite of five months of GCV therapy,
32 the viral load rose from 3.6 log copies/mL in July to 6 log copies/mL at the beginning of
33 November. Then GCV was switched to foscarnet (FOS) on November 18th. On December 5th,
34 UL97 mutation A594P inducing resistance to GCV and UL54 mutation D515Y of unknown
35 significance were found. The viral load decreased at 4 log copies/mL 23 days after initiation
36 of FOS and then at 3.8 log copies/mL on December 18th. She died in a context of
37 thrombocytopenia and cerebral hemorrhage on December 22th.

38 V787A was detected in a HIV patient admitted initially for fever and respiratory tract
39 symptoms (Fig 1.B). On April 2006, CD4 cell count was 14/mm³, and the HIV viral load was
40 5.48 log copies/mL despite cART by stavudine, didanosine, and boosted saquinavir. HIV
41 genotypic resistance testing showed multiple mutations inducing resistance to all reverse
42 transcriptase- and protease-inhibitors currently available. Fever and respiratory tract
43 symptoms were thought to be related to cytomegalovirus infection as cytomegalovirus DNA
44 was detected in broncho-alveolar lavage fluid by PCR, and pp65 antigenemia level was 174
45 marked nuclei /200000 leukocytes. The patient was initiated on GCV (i.e., 5 mg/kg bid for 14
46 days) followed by vGCV maintenance therapy (450 mg bid). vGCV was stopped on June
47 2006, after 45 days of treatment, because of the occurrence of a rash. At that time
48 cytomegalovirus antigenemia was undetectable. Cytomegalovirus infection was monitored by
49 testing pp65 antigenemia twice a month. On August 2006, pp65 antigenemia level was 83
50 nuclei/200000 leukocytes. The patient was initiated on CDV (5 mg/kg IV, once per week

ACCEPTED MANUSCRIPT

51 followed by once per 2 weeks) for a period of one month. CDV was interrupted for ocular
52 hypotonia after 3 infusions and the patient was re-challenged with VGCV for maintenance
53 therapy, which was soon interrupted because of the occurrence of a new rash. On December
54 2006, despite primary prophylaxis with atovaquone, the patient underwent a severe
55 pneumonia related to *Pneumocystis jirovicii* treated with cotrimoxazole and steroids (1
56 mg/kg/day). As pp65 antigenemia level increased to 119 nuclei/200000 leukocytes, he was
57 treated with FOS (90 mg/kg IV bid for 14 days, followed by 90 mg/kg once per day).
58 Cytomegalovirus antigenemia assay became negative. However, in March 2007, while the
59 patient still received FOS maintenance therapy (90 mg/kg IV once a day), antigenemia level
60 was 900 nuclei/200000 leukocytes. A genotypic resistance test identified a V787A
61 substitution in the viral DNA polymerase UL54 combined with common polymorphisms, and
62 no resistance-associated change within the UL97 protein kinase.

63 To generate the mutant viruses we introduced single UL54 mutations (D515Y and V787A)
64 into an EGFP-expressing HCMV BAC (Borst and Messerle, 2000). This HCMV BAC
65 contains an enhanced green fluorescent protein (EGFP) gene in the unique short region and
66 was derived from parental strain pHB5, a BAC-cloned genome of the HCMV laboratory
67 strain AD169 (Borst and al., 1999). We generated the recombinant HCMV strains using the
68 “en passant” mutagenesis, a two-step recombination system for BAC mutagenesis in
69 *Escherichia coli* strain (Tischer et al., 2010). Briefly, a first PCR product, containing a
70 kanamycin gene resistance with two copies of the mutation, was generated using specific
71 primers (see in supplementary data). PCR product is transfected into *Escherichia coli* strain
72 GS1783 with chromosomal-encoded inducible λ phage enzymes and *I-SceI*-expression
73 (Tischer and al, 2010), and recombination with HCMV BAC occurs after induction of the λ
74 phage enzymes. After selection of the kanamycin resistant clones, arabinose-induction of *I-*
75 *SceI* enzyme excises the kanamycin resistance cassette. To reconstitute virus mutants,

ACCEPTED MANUSCRIPT

76 recombinant BACs were transfected into MRC-5 cells (Biomérieux, Lyon, France) using the
77 liposomal reagent Transfast™ (Promega, Madison, USA) following manufacturer's
78 instructions. Presence of mutations in *UL54* gene of each virus was confirmed by sequencing.
79 Focus reduction assay in 48-well plates was used to assess antiviral susceptibilities to GCV,
80 CDV and FOS, as described previously (Ducancelle et al., 2004). The antiviral drug inhibitory
81 concentrations 50% (IC_{50}) for the mutants were compared with those for the wild-type HCMV
82 BAC (Table1). Mutation D515Y located in the pUL54 ExoIII domain induced high-level
83 resistance to GCV and to FOS (6.2 fold and 4.7 fold IC_{50} increases, respectively) Mutations in
84 $\delta C/ExoIII$ region are known to essentially confer cross-resistance against GCV and CDV
85 (Hakki and Chou, 2011). Importantly, our recombinant EGFP virus D515Y remained
86 sensitive to CDV (Table1). The D to Y substitution is the third change so far described at
87 locus 515. Mutation D515E recently published by Fischer et al (2015) has a lower impact on
88 susceptibility to GCV in comparison with D515Y and no impact on FOS and CDV anti-
89 HCMV activity, whereas D515G has no impact on antiviral resistance (Chou et al., 1999;
90 Chou et al., 2003). Substitution V787A located in pUL54 catalytic domain VI induced a high
91 resistance level to GCV and FOS (4.7 and 3.2 fold IC_{50} increases respectively) and did not
92 impact susceptibility to CDV (Table 1). Mutations mapped into regions II, III and VI of the
93 catalytic domain are mostly involved in FOS +/- GCV resistance. It is noteworthy that the V
94 to A substitution at locus 787 induces also high-level drug resistance against both GCV and
95 FOS (Weinberg et al., 2003, Gilbert et al., 2011).

96 To estimate the impact of each mutation on viral fitness we inoculated recombinant strains
97 and AD169-EGFP (wild control) in 48-well MRC-5 culture with a multiplicity of infection
98 (MOI) of 0.01. From day 1 to day 8 post inoculation, fluorescent foci were counted to
99 establish viral growth curves for each recombinant. Growth curves for both mutated strains
100 were similar to that of wild-type HCMV BAC (Figure 2) showing that *UL54* mutations

ACCEPTED MANUSCRIPT

101 D515Y and V787A had no impact on HCMV replication capacity. The tridimensional
102 approach already used for HIV-1 and HCV antiviral susceptibility studies may be very helpful
103 to get insights in the impact of amino acid substitutions on HCMV resistance to antivirals
104 (Rimmert et al., 2014) (Quashie et al., 2012). We showed previously the benefit of mapping
105 new mutations into the whole theoretical structure of pUL54 (Hantz et al., 2013), calculated
106 by homology modeling with the standalone version of MODELLER 9.9 (Eswar et al., 2006)
107 in order to speculate about their putative mechanisms of action (Methodology described in the
108 supplementary data).

109 Since the structure of the herpes simplex virus 1 DNA polymerase was deposited in Protein
110 Data Bank under 2GV9 access number in 2006 (Liu et al., 2006), several homology models
111 have been proposed based on these crystallographic data (Gilbert et al., 2011; Shi et al.,
112 2006). By homology, it is largely assumed that pUL54 is an α polymerase family member
113 organized in six canonical domains involved either in proof reading (or editing) of viral DNA
114 thanks to an 3'-5' exonuclease domain (Fig.3-A), and in polymerase mechanism by its so-
115 called Palm, Thumb and Fingers domains (Fig.3-C).

116 Whether mapping mutations D515Y and V787A in the whole pUL54 structure could help
117 predicting the impact upon susceptibility to antivirals is of great concern. Using pUL54
118 model, we have located amino acid 515 within the 3'-5'-exonuclease domain. Usually,
119 resistance induced by amino-acid changes within this part of the protein concerns both GCV
120 and CDV. Concerning locus 515, both Y and E, which are responsible for GCV resistance, are
121 large non polar amino-acids suggesting that the resistance mechanism implicated is related to
122 the amino-acid size. Carbon alpha of amino acid 515 is close to one of the Mg^{2+} ions
123 constituting the catalytic pocket of the exonuclease domain (i.e. about 8Å on our model,
124 Figure 3B). Hence, electrostatic interaction between Mg^{2+} and the side chain of the mutated
125 residue may impact the distances between catalytic residues D301 and E303 towards the Mg^{2+}

ACCEPTED MANUSCRIPT

126 ions.

127 It is also interesting to emphasize that D515Y constitutes the fifth change in this domain of
128 pUL54 to be depicted as inducing FOS resistance (Ducancelle et al., 2005; Gilbert and
129 Boivin, 2005; Gilbert et al., 2011). Nonetheless, the resistance to FOS at this position is less
130 obvious as the FOS mechanism of action takes place at the interface between fingers and
131 thumb domain by mimicking polyphosphate tail of nucleoside (Zahn et al., 2011). Thus,
132 resistance to FOS localized into the 3'-5' exonuclease domain is still trickier to explain.

133 V787A enlarges the 18 aliphatic to aliphatic mutations list already known (supplementary
134 data Table S1). This list can be split in two major parts: drug-sensitive and drug-resistant
135 mutants. The most striking observation is that drug-sensitive mutations belong to the Palm
136 and 3'-5' exonuclease domains (except L501I). By symmetry, 5 over 6 mutations linked to
137 drug-resistance belong to Fingers domain (Fig. 3-C). Figure 3-D focuses on the 3D mapping
138 of drug-resistance and drug-sensitive mutants in this domain. A careful analysis reveals that
139 mutations involving the core of the Fingers domain (i.e. 781-787 and 809-812 moieties) are
140 the location of antiviral resistance. The core of Fingers domain encloses residues critical for
141 polymerization process (R784, R788, K811 and N815) by grabbing nucleotide for their
142 upcoming insertion in DNA chain (Fig. 3-D). It seems reasonable to propose that an even
143 subtle change of packing at the center of the leucine zipper constituting this domain may alter
144 forces necessary for the antiviral insertion into the elongated strain. However, L501I
145 described by Cihlar et al. (Cihlar et al., 1998) constitutes an exception to this rule and it is less
146 obvious to explain (magenta sphere in Fig. 3-C).

147 To analyze the impact of new mutations of the HCMV polymerase, we could suggest a two-
148 step strategy (3D modeling followed by recombinant virus phenotypic characterization)
149 allowing sharper short-term counseling for clinicians in HCMV drug-resistance in order to
150 propose a more adapted therapy. The 3D homology model allows localizing the change and

ACCEPTED MANUSCRIPT

151 determining its proximity with the catalytic site of the protein. And thus, it helps to identify
152 mutation with a high probability of resistance involvement. On the opposite, if the mutation
153 concerns a not well-structured part and is located far from the catalytic pocket, 3D model
154 cannot be confidently used for counseling. Moreover, this model cannot allow predicting
155 impact of minor changes in amino acid sequence, as shown by mutation L501I, which
156 although highly conservative induces resistance to both GCV and CDV (Erice et al., 1999).
157 The role of every new mutant must be confirmed by recombinant virus phenotypic
158 characterization.

159 Acknowledgments :

160 D.A., G.L., M.D., A.C, S.A. and S.H were supported by grants from the CNR CMV (InVS),
161 the “Région Limousin”, the INSERM and the University of Limoges.

162 References

- 163 Alain, S., Hantz, S., Scieux, C., Karras, A., Mazon, M.C., Szelag, J.C., Imbert, B.M., Fillet,
164 A.M., Gouarin, S., Mengelle, C., et al. (2004). Detection of ganciclovir resistance after
165 valganciclovir-prophylaxis in renal transplant recipients with active cytomegalovirus
166 infection. *J. Med. Virol.* *73*, 566–573.
- 167 Ariza-Heredia, E.J., Neshar, L., and Chemaly, R.F. (2014). Cytomegalovirus diseases after
168 hematopoietic stem cell transplantation: A mini-review. *Cancer Lett.* *342*, 1–8.
- 169 Beam, E., and Razonable, R.R. (2012). Cytomegalovirus in Solid Organ Transplantation:
170 Epidemiology, Prevention, and Treatment. *Curr. Infect. Dis. Rep.* *14*, 633–641.
- 171 Boivin, G., Goyette, N., Farhan, M., Ives, J., and Elston, R. (2012). Incidence of
172 cytomegalovirus UL97 and UL54 amino acid substitutions detected after 100 or 200 days
173 of valganciclovir prophylaxis. *J. Clin. Virol.* *53*, 208–213.

ACCEPTED MANUSCRIPT

- 174 Borst, E., and Messerle, M. (2000). Development of a cytomegalovirus vector for somatic
175 gene therapy. *Bone Marrow Transplant.* 25, S80–S82.
- 176 Borst, E.-M., Hahn, G., Koszinowski, U.H., and Messerle, M. (1999). Cloning of the human
177 cytomegalovirus (HCMV) genome as an infectious bacterial artificial chromosome in
178 *Escherichia coli*: A new approach for construction of HCMV mutants. *J. Virol.* 73, 8320–
179 8329.
- 180 Chevillotte, M., Ersing, I., Mertens, T., and von Einem, J. (2010). Differentiation between
181 Polymorphisms and Resistance-Associated Mutations in Human Cytomegalovirus DNA
182 Polymerase. *Antimicrob. Agents Chemother.* 54, 5004–5011.
- 183 Chou S. (2011) Phenotypic diversity of cytomegalovirus DNA polymerase gene variants
184 observed after antiviral therapy. *J Clin Virol.* 50(4):287-291
- 185 Chou, S., Marousek, G., Guentzel, S., Follansbee, S.E., Poscher, M.E., Lalezari, J.P., Miner,
186 R.C., and Drew, W.L. (1997). Evolution of Mutations Conferring Multidrug Resistance
187 during Prophylaxis and Therapy for Cytomegalovirus Disease. *J. Infect. Dis.* 176, 786–789.
- 188 Chou S, Marousek G, Boivin G, Goyette N, Farhan M, Ives JA, Elston R. (2010)
189 Recombinant phenotyping of cytomegalovirus sequence variants detected after 200 or 100
190 days of valganciclovir prophylaxis. *Transplantation.* 90(12):1409-1413.
- 191 Chou S, Marousek G, Bowlin TL. (2011) Cyclopropavir susceptibility of cytomegalovirus
192 DNA polymerase mutants selected after antiviral drug exposure. *Antimicrob Agents*
193 *Chemother.* 56(1):197-201.
- 194 Chou, S., Lurain, N.S., Weinberg, A., Cai, G.Y., Sharma, P.L., and Crumpacker, C.S. (1999).
195 Interstrain variation in the human cytomegalovirus DNA polymerase sequence and its
196 effect on genotypic diagnosis of antiviral drug resistance. *Adult AIDS Clinical Trials*
197 *Group CMV Laboratories. Antimicrob. Agents Chemother.* 43, 1500–1502.

ACCEPTED MANUSCRIPT

- 198 Chou, S., Lurain, N.S., Thompson, K.D., Miner, R.C., and Drew, W.L. (2003). Viral DNA
199 Polymerase Mutations Associated with Drug Resistance in Human Cytomegalovirus. *J.*
200 *Infect. Dis.* *188*, 32–39.
- 201 Chou, S., Marousek, G., Li, S., and Weinberg, A. (2008). Contrasting drug resistance
202 phenotypes resulting from cytomegalovirus DNA polymerase mutations at the same
203 exonuclease locus. *J. Clin. Virol.* *43*, 107–109.
- 204 Cihlar, T., Fuller, M.D., and Cherrington, J.M. (1998). Characterization of drug resistance-
205 associated mutations in the human cytomegalovirus DNA polymerase gene by using
206 recombinant mutant viruses generated from overlapping DNA fragments. *J. Virol.* *72*,
207 5927–5936.
- 208 Cihlar T, Fuller MD, Mulato AS, Cherrington JM.(1998) A point mutation in the human
209 cytomegalovirus DNA polymerase gene selected in vitro by cidofovir confers a slow
210 replication phenotype in cell culture. *Virology* 248(2):382-393
- 211 Ducancelle, A., Belloc, S., Alain, S., Scieux, C., Malphettes, M., Petit, F., Brouet, J.-C.,
212 Sanson Le Pors, M.-J., and Mazon, M.-C. (2004). Comparison of sequential
213 cytomegalovirus isolates in a patient with lymphoma and failing antiviral therapy. *J. Clin.*
214 *Virol.* *29*, 241–247.
- 215 Ducancelle A, Champier G, Alain S, Petit F, Le Pors MJ, Mazon MC.(2006) A novel
216 mutation in the UL54 gene of human cytomegalovirus isolates that confers resistance to
217 foscarnet. *Antivir Ther.* ;11(4):537-40
- 218 Eckle, T., Prix, L., Jahn, G., Klingebiel, T., Handgretinger, R., Selle, B., and Hamprecht, K.
219 (2000). Drug-resistant human cytomegalovirus infection in children after allogeneic stem
220 cell transplantation may have different clinical outcomes. *Blood* *96*, 3286–3289.
- 221 Erice, A. (1999). Resistance of Human Cytomegalovirus to Antiviral Drugs. *Clinical*
222 *Microbiology Reviews*, *12*(2), 286–297.

ACCEPTED MANUSCRIPT

- 223 Eswar, N., Webb, B., Marti-Renom, M.A., Madhusudhan, M.S., Eramian, D., Shen, M.-Y.,
224 Pieper, U., and Sali, A. (2006). Comparative protein structure modeling using Modeller.
225 Curr. Protoc. Bioinforma. Ed. Board Andreas Baxevanis Al *Chapter 5*, Unit 5.6.
- 226 Fischer, L., Laib Sampaio, K., Jahn, G., Hamprecht, K., and Göhring, K. (2015).
227 Identification of newly detected, drug-related HCMV UL97- and UL54-mutations using a
228 modified plaque reduction assay. *J Clin Virol*
- 229 Gilbert, C., & Boivin, G. (2005). Human Cytomegalovirus Resistance to Antiviral Drugs.
230 *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 49(3), 873–883.
- 231 Gilbert C, Boivin G.(2005) New reporter cell line to evaluate the sequential emergence of
232 multiple human cytomegalovirus mutations during in vitro drug exposure. *Antimicrob*
233 *Agents Chemother.*49(12):4860-4866.
- 234 Gilbert, C., Azzi, A., Goyette, N., Lin, S.-X., and Boivin, G. (2011). Recombinant
235 Phenotyping of Cytomegalovirus UL54 Mutations That Emerged during Cell Passages in
236 the Presence of either Ganciclovir or Foscarnet^v. *Antimicrob. Agents Chemother.* 55,
237 4019–4027.
- 238 Hakki, M., and Chou, S. (2011). The biology of cytomegalovirus drug resistance. *Curr. Opin.*
239 *Infect. Dis.* 24, 605–611.
- 240 Hantz, S., Garnier-Geoffroy, F., Mazon, M.-C., Garrigue, I., Merville, P., Mengelle, C.,
241 Rostaing, L., Marcoux, F.S., Essig, M., Rerolle, J.-P., et al. (2010). Drug-resistant
242 cytomegalovirus in transplant recipients: a French cohort study. *J. Antimicrob. Chemother.*
243 65, 2628–2640.
- 244 Hantz S., Cotin S., Borst E., Couvreur A., Salmier A., Garrigue I. (2013) Novel DNA
245 polymerase mutations conferring cytomegalovirus resistance: input of BAC-recombinant
246 phenotyping and 3D model. *Antiviral Res.* ;98:130–134

ACCEPTED MANUSCRIPT

- 247 Lurain, N. S., & Chou, S. (2010). Antiviral Drug Resistance of Human Cytomegalovirus.
248 *Clinical Microbiology Reviews*, 23(4), 689–712.
- 249 Mousavi-Jazi M, Schloss L, Wahren B, Brytting M.(2003) Point mutations induced by
250 foscarnet (PFA) in the human cytomegalovirus DNA polymerase. *J Clin Virol*.26(3):301-
251 306.
- 252 Quashie, P. K., Mesplède, T., Han, Y. S., Oliveira, M., Singhroy, D. N., Fujiwara, T.,
253 Underwood, M. R., and Wainberg, M. A. (2012) Characterization of the R263K mutation
254 in HIV-1 integrase that confers low-level resistance to the second-generation integrase
255 strand transfer inhibitor dolutegravir. *J. Virol.* 86, 2696–2705.
- 256 Rimmert, B., Sabet, S., Ackad, E., & Yousef, M. S. (2014). A 3D structural model and
257 dynamics of hepatitis C virus NS3/4A protease (genotype 4a, strain ED43) suggest
258 conformational instability of the catalytic triad: implications in catalysis and drug
259 resistivity. *Journal of Biomolecular Structure & Dynamics*, 32(6), 950–958.
- 260 Shi, R., Azzi, A., Gilbert, C., Boivin, G. and Lin, S.-X. (2006), Three-dimensional modeling
261 of cytomegalovirus DNA polymerase and preliminary analysis of drug resistance. *Proteins*,
262 64: 301–307
- 263 S. Liu, J.D. Knafels, J.S. Chang, G.A. Waszak, E.T. Baldwin, M.R. Deibel Jr., D.R. Thomsen,
264 F.L. Homa, P.A. Wells, M.C. Tory, R.A. Poorman, H. Gao, X. Qiu, A.P. Seddon. (2006)
265 Crystal structure of the herpes simplex virus 1 DNA polymerase. *J. Biol. Chem.*, 281, pp.
266 18193–18200
- 267 Tischer, B.K., Smith, G.A., and Osterrieder, N. (2010). En passant mutagenesis: a two step
268 markerless red recombination system. *Methods Mol. Biol. Clifton NJ* 634, 421–430.
- 269 Weinberg, A., Jabs, D.A., Chou, S., Martin, B.K., Lurain, N.S., Forman, M.S., Crumpacker,
270 C., Cytomegalovirus Retinitis and Viral Resistance Study Group, and Adult AIDS Clinical
271 Trials Group Cytomegalovirus Laboratories (2003). Mutations conferring foscarnet

ACCEPTED MANUSCRIPT

272 resistance in a cohort of patients with acquired immunodeficiency syndrome and
273 cytomegalovirus retinitis. *J. Infect. Dis.* 187, 777–784.

274 Karl E. Zahn, Egor P. Tchesnokov, Matthias Götte, and Sylvie Doublé (2011).
275 Phosphonoformic Acid Inhibits Viral Replication by Trapping the Closed Form of the
276 DNA Polymerase. *J. Biol. Chem.* 286: 25246-25255

277

278

ACCEPTED MANUSCRIPT

ACCEPTED MANUSCRIPT

Virus Mutation	GCV		CDV		FOS	
	IC50 (μ M)	Ratio ^b	IC50 (μ M)	Ratio ^b	IC50 (μ M)	Ratio ^b
AD169 BAC	2^a		0.32		40.8^a	
D515Y BAC	15.5 ± 5.3	6.2	0.22 ± 0.1	0.87	146.3 ± 23.9	4.7
V787A BAC	9.8 ± 1.4	4.7	0.22 ± 0.1	0.68	205 ± 7.5	3.2

Table 1: Derivative AD69 BAC-GFP antiviral susceptibilities (D515Y and V787A mutations). Concentrations inhibiting 50% of viral growth (IC₅₀) were obtained from three independent experiments. ^a AD169 IC₅₀ values are mean of all assays, ^b Fold increase in IC₅₀ mean values compared to the average IC₅₀ for the wild type control.

ACCEPTED MANUSCRIPT

A. Patient 1 : kidney recipient for chronic renal failure of undetermined origin

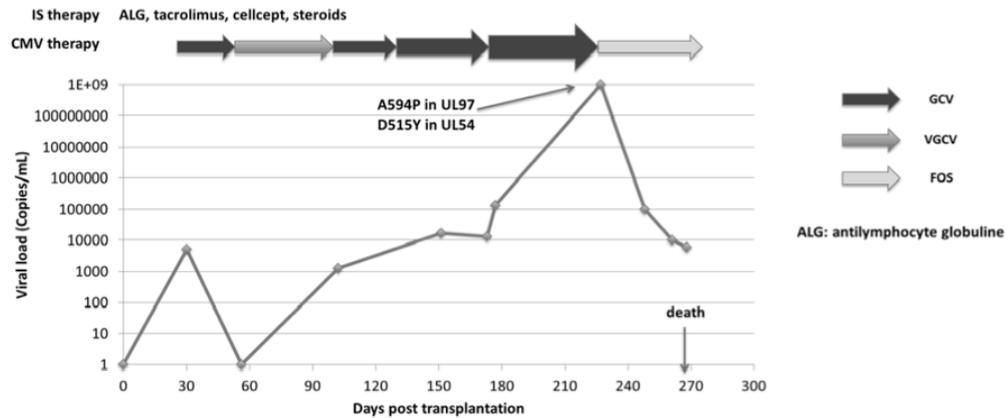
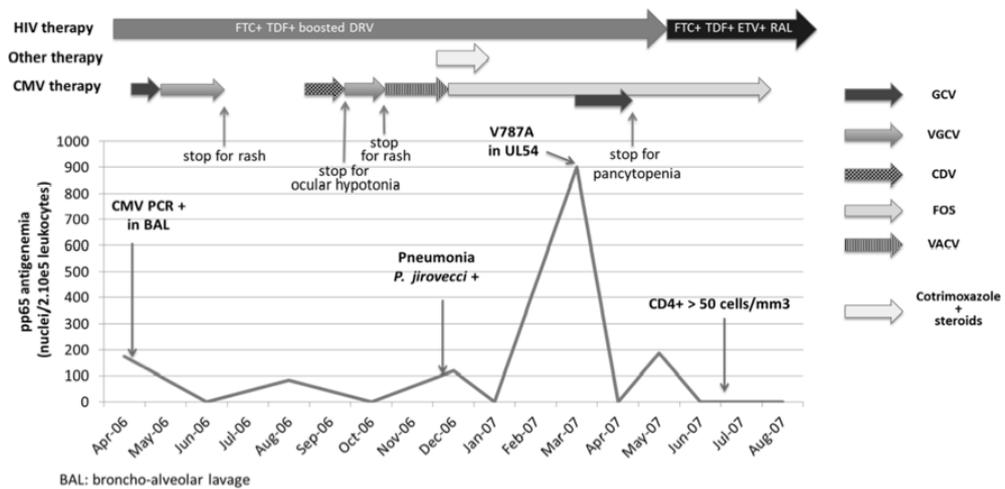
B. Patient 2 : HIV-infected patient with CD4+ count < 50/mm³

Fig. 1: (A) Time line of events and findings for patient 1. (B) Time line of events and findings for patient 2. (ETV: Etravirin; DRV: Darunavir; FTC: Emtricitabin; TDF: Tenofovir; RAL: Raltegravir; VACV: valaciclovir; VGCV: valganciclovir; GCV: ganciclovir; CDV: cidofovir; FOS: foscarnet)

ACCEPTED MANUSCRIPT

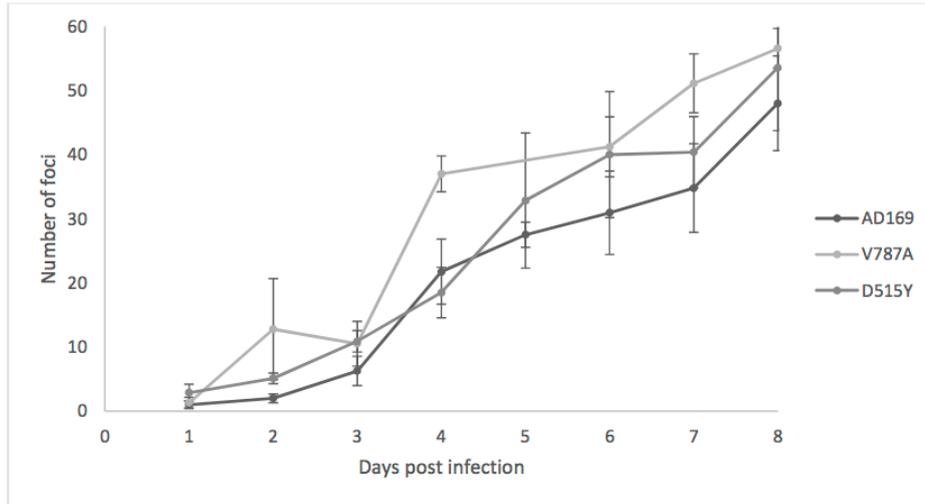


Fig. 2: Growth cycles of the recombinant virus strains HCMV BAC D515Y and V787A in comparison to the parental strain HCMV BAC AD169. Fluorescent foci were counted daily from day 1 to day 8. Curves are representative of three independent experiments.

ACCEPTED MANUSCRIPT

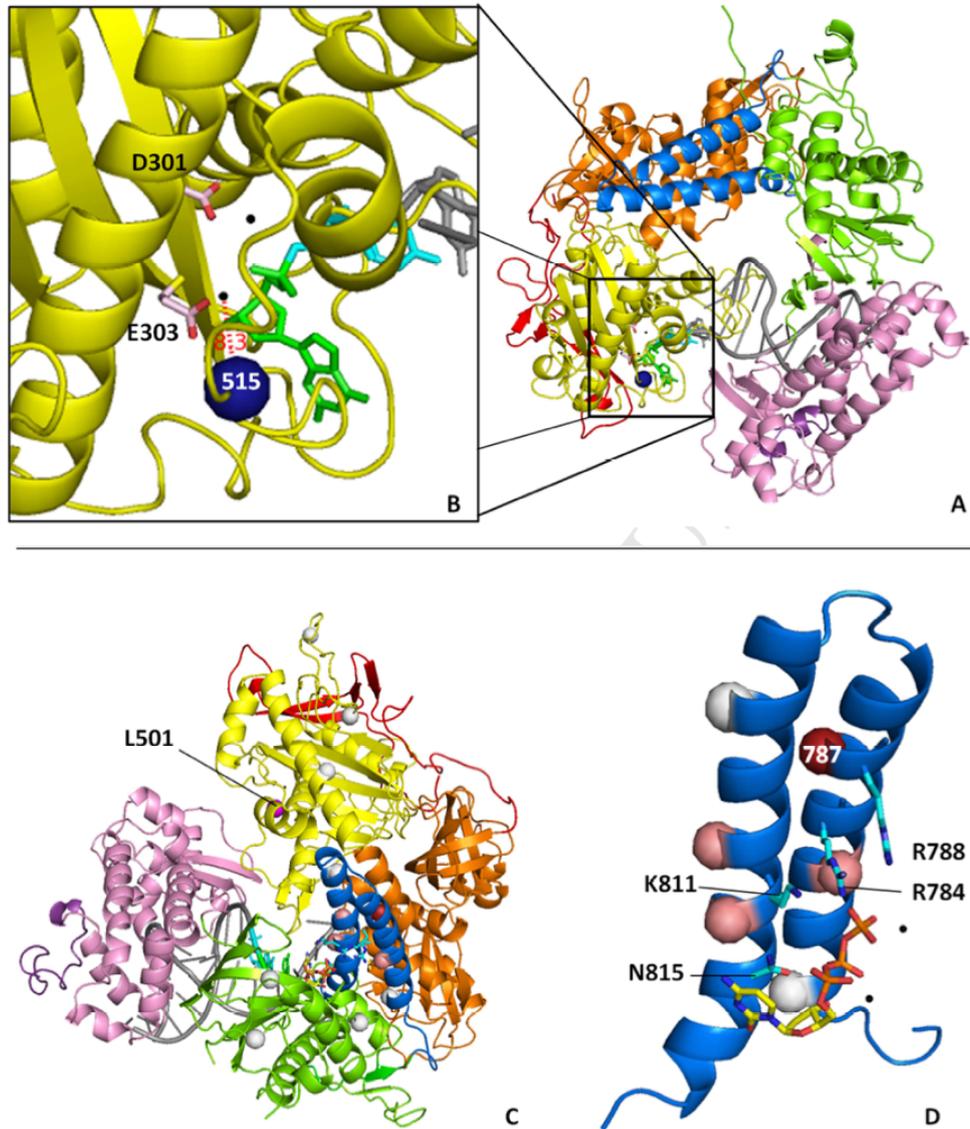


Fig. 3: Overall theoretical structures of pUL54 calculated with MODELLER© are represented in cartoon mode, with two different orientations. For both structures, the different domains according to homology with pUL52 from HSV1 (Liu and al., 2006) are colored as follow: residues 27-98 of pre-NH2-terminal in red, residues 99-295 and 555-600 of NH2-terminal in orange, residues 296-554 of 3'-5' exonuclease in yellow, residues 678-765, 815-877 and 887-982 of palm in green, residues 766-824 of fingers in blue, residues 982-1112 and 1154-1222 of thumb in pink and residues 1223-1242 of the interaction domain with pUL44 in purple. Black dots in active sites stand for metal ions.

A-B. D515Y mutation location; carbon alpha atoms of amino acid 515 is represented in navy blue sphere. The DNA duplex is colored in gray excepted nucleotide $i + 1$ (green) and $i-1$

ACCEPTED MANUSCRIPT

(blue) from scissile phosphate bound. Insets of the 3'-5' exonuclease, catalytic residues are represented in salmon sticks. Distance between Mg^{2+} and carbon alpha of residue 515 is represented by red dashes. C-D. V787A mutation location; white spheres for polymorphisms, magenta spheres for residue 501, salmon spheres for resistances and carbon alpha atoms of amino acid 787 is represented in red sphere.

ACCEPTED MANUSCRIPT

ACCEPTED MANUSCRIPT

- We characterized two previously unknown HCMV UL54 single point mutations found in immunocompromised patients.
- Both mutations induce resistance to ganciclovir and foscarnet, without impact the viral growth kinetics.
- UL54 3D theoretical model allows a better understanding impact of mutations on protein function and resistance mechanism.

ACCEPTED MANUSCRIPT

Tableau IV : Mutations au sein de la polymérase pUL54.

Les résultats sont représentatifs de trois expérimentations indépendantes.

Mutation	GCV		CDV		FOS	
	CI50 (μM)	Ratio	CI50 (μM)	Ratio	CI50 (μM)	Ratio
BAC H686Y	2,7 \pm 0,9	1,6	0,7 \pm 0,2	3,9	85,2 \pm 118	2
BAC G698V	4,3 \pm 2	1,6	1,7 \pm 0,7	2,2	246,5 \pm 133,7	6,6
BAC N710K	2,7 \pm 1,9	1,3	0,3 \pm 0,1	1,4	88,8 \pm 79,1	1,2
BAC I726T	1,7 \pm 0,3	0,7	0,3 \pm 0,2	2,6	29 \pm 27	0,5
BAC P747L	1,4 \pm 0,7	0,6	0,3 \pm 0,2	1,3	58,1 \pm 25	2,7

GCV : Ganciclovir ; CDV : Cidofovir ; FOS : Foscarnet

Tableau V : Mutations au sein de la kinase pUL97.

Les résultats sont représentatifs de trois expérimentations indépendantes.

Mutation	GCV		CDV		FOS		MBV	
	CI50 (μM)	Ratio						
BAC F342Y	7,9 \pm 7	2,9	0,14 \pm 0,04	0,9	35,8 \pm 13,5	1,8	0,2 \pm 0,09	1
BAC H393Y	2,8 \pm 1,5	1,2	0,4 \pm 0,2	1,2	33,9 \pm 17,7	1	0,4 \pm 0,2	1,3

GCV : Ganciclovir ; CDV : Cidofovir ; FOS : Foscarnet ; MBV : Maribavir

Caractérisation de nouvelles mutations détectées au sein de la polymérase pUL54 et de la kinase pUL97

Au cours de ce travail, de nouvelles mutations non décrites dans la littérature ont été caractérisées. Ce projet collaboratif a été mené conjointement avec le Dr. Déborah Andouard, post-doctorante, pour la réalisation des essais cellulaires.

Par l'intermédiaire du Centre National de Référence des Cytomégalovirus (CNR CMV), plusieurs nouvelles mutations ont été détectées par analyse génotypique chez des patients présentant une non-réponse au traitement antiviral instauré (persistance d'une charge virale positive malgré un traitement bien conduit). Le profil des patients est assez varié comportant notamment des transplantés d'organe solide comme des greffés de moelle, suivis dans de nombreux centre de transplantation français.

Concernant les mutations de la polymérase virale pUL54 que nous avons eues à étudier, la mutation H686Y a été détectée chez un patient ayant reçu une greffe de cellules souches hématopoïétiques à Lyon conjointement à une mutation A594V dans *UL97* après traitement par GCV. Deux autres patients (un transplanté rénal et un enfant infecté congénitalement) ont présenté également cette mutation après traitement par GCV ou VGCV mais sans mutation de *UL97*. La mutation G698V a été mise en évidence chez plusieurs patients transplantés rénaux à Limoges et Saint-Etienne traités par VGCV sans mutation de pUL97. La mutation N710K a été détectée chez un patient ayant reçu du GCV et du FOS, suivi à Rennes (gène *UL97* inamplifiable). La mutation I726T a été détectée chez un transplanté rénal (Bordeaux) ayant reçu plusieurs lignes thérapeutiques (VACV, VCGV/GCV et FOS), sans mutation associée de pUL97. La mutation P747L a été retrouvée chez 7 patients transplantés de différents centres dont un seul présentait une souche avec une mutation de pUL97 (délétion 594 + 598-601), tous ayant reçu du VGCV ou du GCV.

Au niveau de la kinase virale pUL97, la mutation F342Y a été retrouvée chez un greffé cardiaque à Lyon ne répondant pas à un traitement par VGCV sans autre mutation dans pUL97 ou pUL54 et chez un greffé rénal suivi à Limoges en parallèle d'une mutation M460V de pUL97 sans mutation de pUL54. La mutation H393Y a été observée chez un patient transplanté

cardiaque (Bordeaux) sans mutation associée et 2 transplantés rénaux (Besançon), l'un avec une mutation M460V et l'autre avec une mutation H520Q.

Au niveau de la polymérase virale pUL54, la mutation H686Y semble conférer une résistance au CDV. Nos résultats devront être confirmés par d'autres essais antiviraux car bien que l'IS50 soit supérieur à 3, la CI50 est assez faible et les écart-types entre les différentes manipulations sont assez élevés. La substitution G698V induit une résistance au FOS. Les mutations N710K, I726T et P747L ne confèrent pas de résistance aux antiviraux testés (**Tableau IV**).

Le comptage du nombre de foyers d'infection en fonction du temps nous permet d'évaluer la capacité répliquative d'un virus recombinant en comparaison avec la souche sauvage. Les courbes de croissance pour les souches mutées H686Y, G698V et N710K sont semblables à celles du BAC CMVH de type sauvage montrant que ces mutations n'ont aucun impact sur la réplication virale. La présence des mutations I726T ou P747L font diminuer significativement le nombre de foyers d'infection au cours du temps en comparaison à la souche sauvage (**Figure 20**). Les amorces utilisées pour la construction des différents virus recombinants sont données en annexe.

La substitution F342Y située au niveau du site de liaison de l'ATP de pUL97 induit une résistance au GCV. La mutation H393Y situées dans le domaine d'autophosphorylation de pUL97 n'induit pas de résistance au GCV ou au MBV et naturellement pas de résistance au FOS et CDV (**Tableau V**). Les courbes de croissance pour les souches recombinantes H393Y et F342Y sont semblable à celle du BAC CMVH sauvage (**Figure 21**). Les amorces utilisées pour la construction des différents virus recombinants sont données en annexe.

Ainsi, le rôle de chaque nouveau mutant détecté au sein de la polymérase pUL54 et de la kinase pUL86 a été évalué par une caractérisation phénotypique du virus recombinant. Concernant pUL54, la mutations H686Y pourrait induire une résistance au CDV et la mutation G698V confère une résistance au FOS. Pour pUL97, la mutation F342Y confère une résistance au GCV. Les mutations de la polymérase virale pUL54 I726T et P746L font diminuer le nombre de foyers d'infection au cours du temps en comparaison à la souche sauvage.

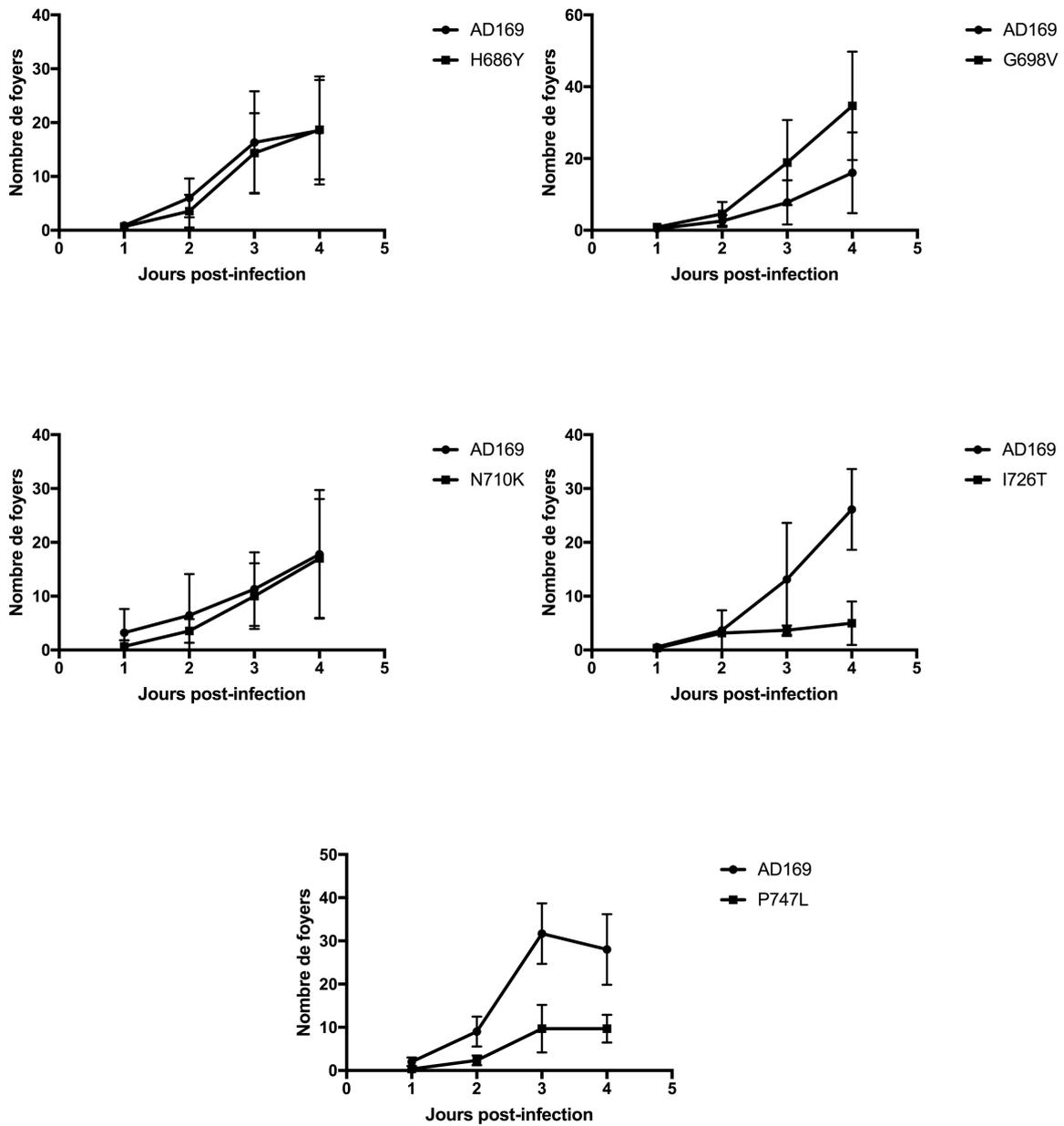


Figure 20 : Impact de mutations de la polymérase virale pUL54 sur la réplication du CMVH. Le comptage des foyers d'infection a été réalisé sur 4 jours. Les courbes sont représentatives de trois expérimentations indépendantes.

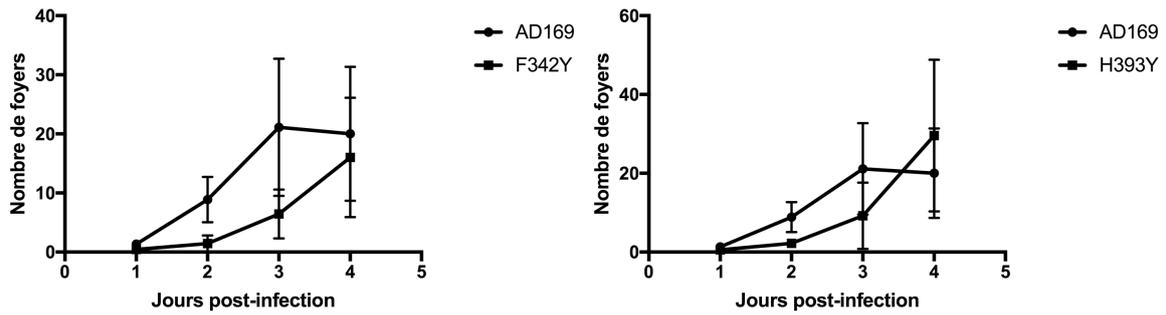


Figure 21 : Impact des mutations F342Y et H393Y de la kinase virale pUL97 sur la réplication du CMVH. Le comptage des foyers d'infection a été réalisé sur 4 jours. Les courbes sont représentatives de trois expérimentations indépendantes.

ANALYSES DE NOUVELLES CIBLES THERAPEUTIQUES

Le deuxième axe de notre travail a porté sur l'étude de la relation structure - fonction de nouvelles cibles thérapeutiques ; les protéines appartenant aux complexes terminase et hélicase-primase du CMVH.

Comme discuté dans la revue « *Human cytomegalovirus terminase complex as an antiviral target, a close up view* » présentée précédemment, le complexe terminase présente de nombreux avantages comme nouvelle cible thérapeutique. Tout d'abord, ce complexe protéique est exclusivement viral et ne possède pas d'homologue cellulaire, limitant probablement les phénomènes de toxicité. Ce complexe, indispensable à la réplication virale, est hautement conservé chez les bactériophages et les virus de la famille des *Herpesviridae*. Ces caractéristiques expliquent l'intérêt grandissant porté sur ce complexe comme nouvelle cible pour le développement de potentiels anti-CMVH. Le développement prometteur du letermovir conforte l'intérêt porté pour ce complexe.

Depuis les années 2000, des composés dérivés de thiazolylphenyle ont montré une activité antivirale, ciblant les complexes hélicase-primase d'HSV-1, HSV-2 et du VZV. Deux molécules, le pritelevir et l'amenamivir sont efficaces dans le traitement de l'herpès de type 1 et 2 (**Chono et al., 2010**) (**Wald et al., 2014**). Néanmoins, ces deux molécules n'ont pas montré d'activité contre le CMVH. Devant le développement de ces molécules, le complexe hélicase-primase du CMVH pourrait aussi devenir une cible de choix dans le traitement de l'infection à CMVH.

Enfin, la connaissance de la structure mais aussi des rôles fonctionnels des protéines constituant ces deux complexes pourrait permettre à la fois le développement de nouveaux anti-CMVH (anticorps, peptides, molécules), mais aussi de mieux appréhender le mécanisme d'action de certaines molécules existantes comme le letermovir.

Ainsi, nos études ont plus particulièrement porté sur la sous-unité pUL56 du complexe terminase mettant notamment en évidence les résidus essentiels à la stabilisation du doigt de zinc présent en N-terminal de pUL56 et la présence d'un motif endonucléase permettant

d'inclure pUL56 au sein de la famille des LAGLIDADG Homing Endonucléase. Enfin, nous avons pu mettre en évidence une courte séquence au sein de pUL56 nécessaire à son interaction avec son partenaire pUL89. La deuxième partie de cet axe nous ont permis de mettre en évidence les résidus essentielles du site de fixation de l'ATP de l'hélicase (pUL105) et à la stabilisation du doigt de zinc retrouvé au sein de la primase (pUL70).

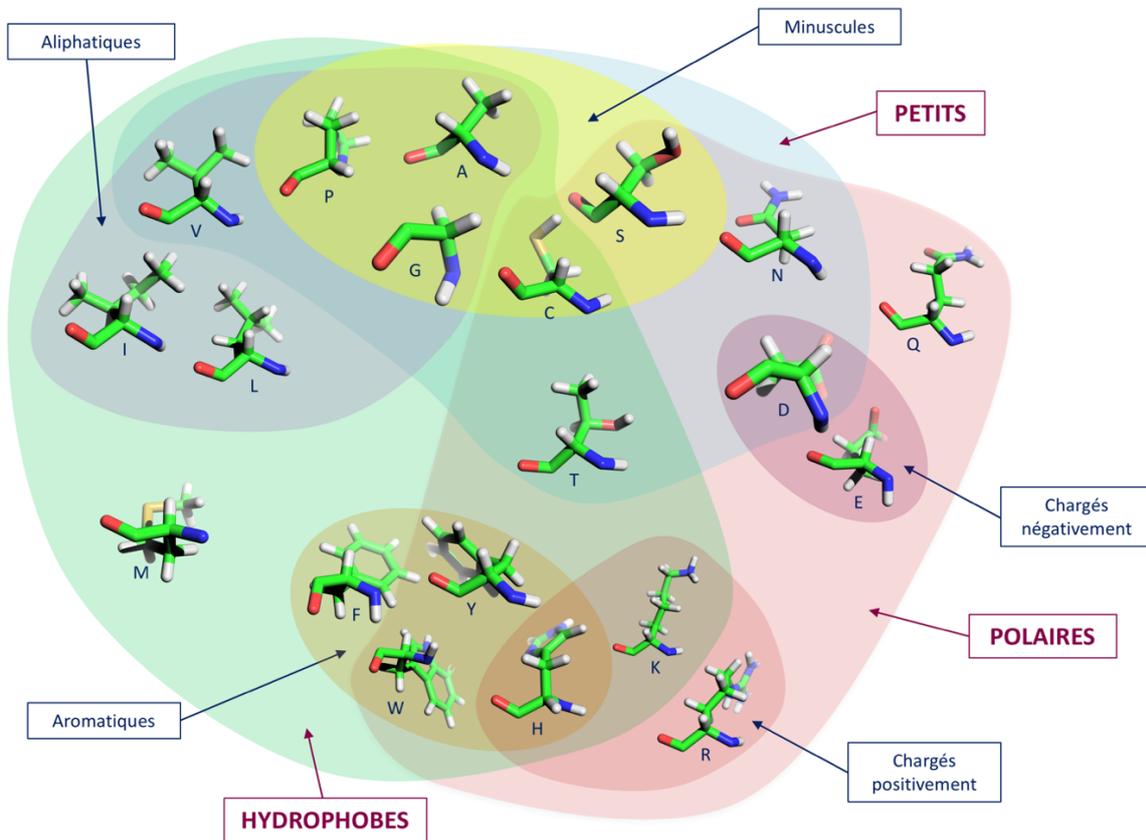


Figure 22 : Diagramme de Venn des vingt acides aminés naturels. Chaque acide aminé différent est constitué par le même squelette, une fonction amine et une fonction acide. Les chaînes latérales portées par le carbone alpha permettent de classer chaque résidu en différents groupes partageant certaines caractéristiques.

Encart. Etude de la relation structure-fonction de protéines, recherche de domaines fonctionnels

Puisqu'une grande partie de notre étude expérimentale s'articule autour de la relation structure-fonction de protéines virales, il convient, dans un premier temps, de donner quelques rappels sur la structure des protéines et la démarche expérimentale permettant de prédire des domaines fonctionnels.

*Constituants des protéines, on distingue vingt acides aminés différents qui présentent le même squelette, une fonction amine et une fonction acide. Les chaînes latérales portées par le carbone alpha permettent de classer chaque acide aminé en différents groupes partageant certaines caractéristiques notamment chimiques pouvant intervenir dans la structure et la fonction des protéines (**Figure 22**) (**Tableau VI**). Il existe quatre niveaux de structuration, pour arriver à une structure protéique fonctionnelle, définis par le degré de repliement (primaire, secondaire et tertiaire). Généralement linéaire, la séquence primaire correspond à l'ordre des acides aminés le long de la chaîne polypeptidique.*

*La comparaison de plusieurs séquences protéiques permet notamment d'identifier des régions et des acide aminés conservés et par conséquent de putatifs domaines fonctionnels (séquences consensus). En effet, les structures primaires, secondaires et tertiaires de protéines ayant un ancêtre commun ne divergent peu au niveau des domaines essentiels à la fonction. Par conséquent, au cours de l'évolution, les mutations situées au niveau de ces domaines se retrouvent moins nombreuses (**Chothia and Lesk, 1986**) (**Zvelebil et al., 1987**). Ainsi, la phylogénie est d'une importance cruciale pour la compréhension de la fonction des protéines.*

Les chaînes polypeptidiques peuvent prendre plusieurs types de structures régulières (structure secondaire). Les plus couramment retrouvées au sein des protéines sont les hélices alpha et les feuillets bêta. Une hélice alpha est formée par l'enroulement sur elle-même d'une chaîne polypeptidique de forme hélicoïdale stabilisée par des liaisons hydrogènes. Les chaînes latérales des résidus sont dirigés vers l'extérieur permettant notamment l'interaction avec d'autres résidus. En effet les domaines d'interactions protéine-protéine riche en leucine ou isoleucine (« leucine zipper ») sont généralement composés d'hélices alpha. Les feuillets bêta sont composés de brins bêta reliés par des liaisons hydrogènes. C'est une structure plus lâche et plane que l'hélice alpha. Il existe deux types de dispositions d'un feuillet bêta (feuillets bêta

parallèles et feuilletts bêta antiparallèles). Certains acides aminés ont une préférence pour une structure donnée.

La structure tertiaire d'une protéine est stabilisée par différentes liaisons (interactions hydrophobes, électrostatiques, forces de Van des Waals, ponts disulfures) entre les différents acides aminés et différents domaines (structures secondaires). Des structures tertiaires peuvent devenir des motifs permettant notamment les interactions protéine-protéine ou la fixation de la protéine à l'ADN. On retrouve notamment le « doigt de zinc » qui est caractérisé par une boucle stabilisée à la base par la coordination d'un atome de zinc par des cystéines ou des histidines. Le « leucine zipper » est constitué d'une hélice amphipathique contenant des résidus leucine ou isoleucine répétées régulièrement. Ce motif peut ainsi permettre l'interaction de deux sous-unités d'un complexe ou la dimérisation d'une protéine. En outre, une fixation à l'ADN de la protéine est possible grâce à la présence d'un domaine basique à la base des deux hélices.

La structure quaternaire provient de de liaisons entre plusieurs chaînes polypeptidiques possédant chacune sa propre structure tertiaire. En effet, certaines protéines sont constituées de plusieurs sous-unités.

Il est possible de connaître la structure d'une protéine par analyse cristallographique (diffraction des rayons X). Ainsi, à ce jour, des milliers de structures tridimensionnelles sont disponibles dans la « Protein Data Bank » (PDB). Néanmoins, cette technique nécessite une quantité de protéine pure importante. En l'absence de structure expérimentale, cette base de données permet de construire des structures théoriques par modélisation (par homologie ou comparative).

Enfin, la délétion de certains domaines ou la substitution de certains résidus, prédit in silico, par mutagénèse fournit des renseignements sur le rôle de ces différents acides aminés.

Tableau VI : Listes des vingt acide aminés naturels avec leurs codes à une et trois lettres.

Nom complet de l'acide aminé	Code à une lettre	Code à trois lettres
Acide glutamique	E	Glu
Acide aspartique	D	Asp
Alanine	A	Ala
Arginine	R	Arg
Asparagine	N	Asn
Cystéine	C	Cys
Glutamine	Q	Gln
Glycine	G	Gly
Histidine	H	His
Isoleucine	I	Ile
Leucine	L	Leu
Lysine	K	Lys
Méthionine	M	Met
Phénylalanine	F	Phe
Proline	P	Pro
Sérine	S	Ser
Thréonine	T	Thr
Tryptophane	W	Trp
Tyrosine	Y	Tyr
Valine	V	Val

ETUDE DU COMPLEXE TERMINASE

Mise en évidence de motifs essentiels à la réplication virale au sein de la sous-unité pUL56

Le complexe terminase (pUL56-pUL89-pUL51) est un élément essentiel au processus d'encapsidation qui permet l'intégration d'une unité de génome dans une procapside vide. Plusieurs études ont suggéré que la sous-unité pUL56 comportait un grand nombre de motifs fonctionnels nécessaires à l'activité du complexe terminase. Ainsi, comme discuté dans la revue « *Human cytomegalovirus terminase complex as an antiviral target, a close up view* » présentée précédemment, la grande sous-unité du complexe terminase est composée de 12 régions conservées (I-XII). Cette protéine hautement conservée d'environ 130 kDa présente une tendance à se dimériser. pUL56 est notamment impliquée dans l'activité ATPase du complexe et la reconnaissance de motifs cis-régulateurs « *pac* » nécessaires au clivage des concatémères d'ADN, produit de la réplication virale. Néanmoins, bien que pUL56 présente de nombreux sites fonctionnels, à ce jour, aucune structure cristalline n'a été obtenue et son association avec les autres protéines du complexe n'a pas été élucidée. En outre, malgré les progrès réalisés dans la compréhension de la structure quaternaire putative de pUL56, ses domaines fonctionnels et leur rôle relatif dans la liaison à l'ADN, l'activité nucléase ou les interactions avec ses partenaires restent peu clairs.

Des alignements de séquences et une analyse de la structure secondaire de pUL56 nous ont permis de prédire plusieurs acides aminés pouvant avoir un rôle essentiel dans le fonctionnement du complexe terminase. Ainsi, En N-terminal de la sous-unité pUL56, un motif LATLNDIERFL (résidus 134 à 144) caractéristique des LAGLIDADG *Homing Endonuclease* a été mis en évidence. Cette famille de protéines correspond à des enzymes de clivage d'ADN site spécifique. Dans le cas des homodimères, la structure est formée par deux motifs situés en N-terminal de la protéine. Ainsi, le motif LAGLIDADG est impliqué dans l'interface où les résidus hydrophobes leucine et isoleucine participent à la dimérisation. Les résidus acides conservés comme le glutamate ou l'aspartate permettent la chélation d'ions (essentiellement Mg^{2+} et Ca^{2+}) essentiel à l'activité catalytique du dimère (Chevalier et al., 2001). De plus, les LAGLIDADG *Homing Endonuclease* possèdent un motif de fixation à l'ADN situé en aval du

motif LAGLIDADG (**Chevalier et al., 2001**). De façon intéressante, à proximité du motif LATLN_DIERFL de la sous-unité pUL56, une région hautement conservée pourrait former un motif putatif en doigt de zinc de trois façons différentes faisant intervenir des résidus cystéines et histidines C191-X₂-C194-X₂₂-C217-X-H219 (CCCH), C191-X₂-C194-X₂₂-C217-X₅-H223 (CCCH) et C191-X₂-C194-X₂₄-H219-X₃-H223 (CCHH) (**Champier et al., 2008**). Ce motif appartient à une région de pUL56 portant la mutation Q204R qui confère une résistance au BDCRB (**Krosky et al., 1998**).

Afin d'étudier l'implication de ces motifs putatifs dans la réplication du CMVH, nous avons envisagé une approche mutationnelle. Ainsi, la production de virus recombinants par la technologie des BAC portant une mutation ou des combinaisons de mutations ont permis, après transfection en cellules humaines, de montrer le caractère essentiel de ces motifs dans la réplication virale. En effet, contrairement à la substitution de l'acide aspartique 139, celle de l'acide glutamique 141 bloque la réplication virale. La mutation des acides aminés leucine et isoleucine formant un hypothétique « *leucine zipper* » réduit la capacité du virus à produire de nouveaux virions infectieux et des combinaisons de mutations entraînent une incapacité du virus à produire des virions infectieux. Nous avons également ainsi identifié le motif de liaison au zinc impliquant les résidus cystéines et histidine au sein de la séquence C191-X₂-C194-X₂₂-C217-X-H219 (CCCH).

En accord avec ce qui est retrouvé chez les LAGLIDADG *Homing Endonuclease*, à travers le motif LATLN_DIERFL, pUL56 pourrait dimériser, permettant ainsi une interaction de deux glutamates (E141) potentiellement impliqués dans la coordination des ions divalents Mg²⁺ du site catalytique. Quelques acides aminés plus loin, on retrouve un motif de fixation à l'ADN permettant probablement une stabilisation du complexe protéique sur l'ADN.

Nos résultats suggèrent que ces deux motifs LATLN_DIERFL et doigt de zinc, situés en N-terminal de pUL56, sont nécessaires à la conformation de pUL56 et à ses fonctions tels que la fixation à l'ADN et/ou son activité nucléase. Leur caractère essentiel fait de ces motifs des cibles antivirales potentielles pour le développement de nouveaux inhibiteurs des terminases.

Ces résultats ont fait l'objet d'un deuxième article :

Highlighting of a LAGLIDADG and a zing finger motifs located in the pUL56 sequence crucial for HCMV replication

Ligat, G., Couvreur, A., Cazal, R., Alain, S., Hantz, S.

En préparation pour soumission à « *PLOS Pathogens* »

(Les données complémentaires de l'article sont données en annexes)

Highlighting of a LAGLIDADG and a zinc finger motifs located in the pUL56 sequence crucial for HCMV replication

Ligat, G.^{1,2}, Couvreur, A.¹, Cazal, R.¹, Alain, S.^{1,2*}, Hantz, S.^{1,2*}

¹Université Limoges, INSERM, CHU Limoges, UMR 1092, Limoges, France

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

* These authors contributed equally to the manuscript.

Corresponding authors:

Sébastien Hantz UMR 1092, CBRS, Hopital Dupuytren, 2 avenue ML King, 87000 Limoges.
sebastien.hantz@unilim.fr

Sophie Alain UMR 1092, CBRS, Hopital Dupuytren, 2 avenue ML King, 87000 Limoges.
sophie.alain@unilim.fr

ABSTRACT

The human cytomegalovirus (HCMV) terminase complex is part of DNA-packaging machinery that delivers a unit-length genome into a procapsid. In a previous study, we identified conserved domains within pUL56, the large terminase subunit of the HCMV. In this study, we identified a LATLNDIERFL and confirmed a zinc finger pattern in N-terminal part of pUL56. Recombinant viruses were generated with specific serine or alanine substitutions in these putative patterns. We identified a LATLNDIERFL pattern characteristic of LAGLIDADG homing endonuclease. We also identified a metal-binding pattern involving the cysteine and histidine residues within the sequence C191-X₂-C194-X₂₂-C217-X-H219 (CCCH) near the region conferring letermovir resistance. These patterns are crucial for viral replication suggesting that

they are essential for pUL56 structure and function. Thus, these patterns represent potential antiviral targets for the development of new antivirals such as small molecules, peptides or antibodies and maybe allow to better understand the letermovir mechanism of action.

INTRODUCTION

Human cytomegalovirus (HCMV) is a betaherpesvirus responsible for significant morbidity and mortality in immunocompromised patients, especially among transplant recipients and patients with AIDS. To date, current antiviral inhibitors target the viral DNA polymerase including ganciclovir, cidofovir and foscarnet. One of the limitations of these antivirals is their significant dose-limiting toxicity. Furthermore, they have a poor oral bioavailability and prolonged treatment can cause cross-resistance (Alain et al., 2004) (Hantz et al., 2010) (Lurain and Chou, 2010) (Andouard et al., 2016). Thus, developing new drugs not targeting the viral polymerase, pUL54, becomes compulsory. A promising therapeutic alternative, letermovir (also known as AIC246 in clinical trial) interferes with the HCMV DNA-packaging stage. In phase II trials, AIC246 was effective in prevention of HCMV infection in allogenic hematopoietic-cell recipients with an acceptable safety profile (Chemaly et al., 2014), data recently confirmed in a Phase III trial (clinicaltrials.gov NCT02137772). The mechanistic studies suggested that the drug targets the pUL56 subunit of the viral terminase complex but nothing more precise is currently known (Lischka et al., 2010) (Goldner et al., 2011) (Melendez and Razonable, 2015). Although, resistance observed both in *UL56* and *UL89* and proximity of the selected *UL89* and *UL56* mutations suggest that letermovir targets a functional locus involving pUL56 and pUL89 interaction (Chou, 2017), the lack of structural and functional data must be filled to better understand letermovir mechanism and design additional drugs, peptides or antibodies.

HCMV terminase complex (pUL89-pUL56) is a critical component of the DNA-packaging machinery which aims to translocate a unit of viral DNA genome into an empty capsid. The proteins pUL51, pUL52, pUL77 and pUL93 seem to be part of the terminase complex or involved in the DNA cleavage/packaging process. However, little is known about these proteins (Borst et al., 2008) (Borst et al., 2013) (Borst et al., 2016) (DeRussy and Tandon, 2015). Evidences suggest that the large subunit pUL56 has an essential role in this process, carrying many of the functional domains required for DNA-packaging.

pUL56 is the large subunit of HCMV terminase complex and is the gene product of ORF *UL56* located on the unique long portion of the viral genome. Its sequence is composed of 12

conserved regions annotated from I to XII (Champier et al., 2008). This highly conserved protein of about 130 kDa can establish interactions with many partners. First, it has been observed by cryo-microscopy that pUL56 tends to self-assembly leading to a functional homodimer (Savva et al., 2004). It has also been proven that it interacts with importin alpha through a Nuclear Localization Signal pattern located in its very C-terminal (amino acids 816-827) for its subsequent translocation into the nucleus to achieve maturation and translocation of viral DNA with help of its terminase complex partners. The translocation process is partly powered by its ATPase activity which is enhanced when it is associated with pUL89 (Hwang and Bogner, 2002) through the short sequence ${}_{671}\text{WMVVKYMGGFF}_{680}$ as we recently suggested (Ligat et al., 2017). The maturation of DNA consists in its cleavage from linear to unit length viral DNA. Besides pUL89 is able to cleave non-specifically DNA strands through an RNase H/integrase-like fold, pUL56 is able to recognize, and subsequently cleave, « *pac* » motifs (« *cis-acting packaging signal* ») located in the *a* sequence of the terminal and internal repeat segments (Scholz et al., 2003).

Previously, sequences analysis highlighted a highly conserved region that could form a putative zinc-finger pattern in three different ways C191-X₂-C194-X₂₂-C217-X-H219 (CCCH), C191-X₂-C194-X₂₂-C217-X₅-H223 (CCCH), and C191-X₂-C194-X₂₄-H219-X₃-H223 (CCHH) (Champier et al., 2008). Interestingly, the Q204R mutation that confers BDCRB resistance is located in the center of this region (Krosky et al., 1998).

To date, nor overexpression neither homology modeling succeeded to obtain a reliable structure of pUL56. To address the question regarding the nuclease mechanism of pUL56, we proceeded to a meticulous analysis of its primary sequence and predicted secondary structure. This work was combined to the state-of-the-art concerning nuclease structures reviewed by Yang in 2011 (Yang, 2011). Nucleases fall into more than twelve families depending of function, structure or substrate. Besides the core structure of most of them, fold into complicated β α arrangements (e.g. DnaQ-like, RnaseH, FEN like, REC-J families), simple β -hairpins are also encountered in DEK and Rnase II members. Despite those strong structural discrepancies, one or more carboxylate amino acids are often in the catalytic site center to bind divalent ions whereas water molecule, or histidine in some cases, constitute the nucleophilic component of a SN2 reaction for DNA (respectively RNA) cleavage. Homing

endonucleases are another family of nucleases widely represented over all branches of life. Among their members, we can distinguish the LAGLIDAGD group.

In this report, we present sequences analysis which allows to assume the existence of a ${}_{134}\text{LATLNDIERFL}_{144}$ pattern characteristic of LAGLIDADG homing endonuclease. This proteins family recognizes specific DNA sequences for their subsequent cleavage. The structure of several members of LAGLIDADG homing endonucleases have already been resolved at the atomic level (Chevalier et al., 2001) (Li et al., 2009) (Takeuchi et al., 2011). Interestingly, some homodimeric members of LAGLIDAGD homing endonucleases have already been widely studied. *I-Crel* (PDB: 1G9Y) and *I-Ceul* (PDB: 2EX5) structures present a highly specific two-fold symmetry axis located in the very N-terminal of each subunits. LAGLIDADG patterns constitute one side of a leucine-zipper through conserved hydrophobic amino acids (i.e. leucine and isoleucine). This tertiary structure allows to constitute a negatively charged cluster of carboxylate residues (i.e. aspartates) able to chelate positively charged ions (mostly calcium or magnesium) essential for DNA cleavage. Moreover, LAGLIDADG homing endonucleases have a DNA recognition region (DRR) motif located one hundred residues downstream from the LAGLIDADG pattern (Chevalier et al., 2001) (Silva et al., 1999). In this study, we have employed mutational approaches to investigate putative LATLNDIERFL and DNA binding patterns of pUL56. We identify a LATLNDIERFL pattern characteristic of LAGLIDADG homing endonuclease and a metal-binding motif involving the cysteine and histidine residues within the sequence C191-X₂-C194-X₂₂-C217-X-H219 (CCCH) near the region conferring letermovir resistance (Chou, 2015). These motifs are essential for pUL56 structure and function and represents potential antiviral targets. Taken together, we propose that pUL56 subunit of terminase complex belongs to the LAGLIDADG homing endonuclease family.

Table 1: Overview of HCMV-BAC-UL56 mutants in putative LATLNDIERFL and zinc-finger patterns and their respective amino acid exchanges

Amino acids ^a	Mutation(s)	Mutant HCMV-BAC
LATLNDIERFL	LATLNAIERFL	UL56 D139A
LATLNDIERFL	LATLNDIARFL	UL56 E141A
LATLNDIERFL	AATLNDIERFL	UL56 L134A
LATLNDIERFL	LATANDIERFL	UL56 L137A
LATLNDIERFL	LATLNDIAERFL	UL56 I140A
LATLNDIERFL	LATLNDIERFA	UL56 L144A
LATLNDIERFL	AATANDAERFA	UL56 L134A L137A I140A L144A
LATLNDIERFL	LATLNDIAERFA	UL56 I140A L144A
LATLNDIERFL	AATLNDIERFA	UL56 L134A L144A
C-X ₂ -C-X ₈ .NQG-X ₁₁ -C-X-H-X ₃ -H	S-X ₂ -C-X ₈ .NQG-X ₁₁ -C-X-H-X ₃ -H	UL56 C191S
C-X ₂ -C-X ₈ .NQG-X ₁₁ -C-X-H-X ₃ -H	C-X ₂ -S-X ₈ .NQG-X ₁₁ -C-X-H-X ₃ -H	UL56 C194S
C-X ₂ -C-X ₈ .NQG-X ₁₁ -C-X-H-X ₃ -H	C-X ₂ -C-X ₈ .NQG-X ₁₁ -S-X-H-X ₃ -H	UL56 C217S
C-X ₂ -C-X ₈ .NQG-X ₁₁ -C-X-H-X ₃ -H	C-X ₂ -C-X ₈ .NQG-X ₁₁ -C-X-A-X ₃ -H	UL56 H219A
C-X ₂ -C-X ₈ .NQG-X ₁₁ -C-X-H-X ₃ -H	C-X ₂ -C-X ₈ .NQG-X ₁₁ -C-X-H-X ₃ -A	UL56 H223A
C-X ₂ -C-X ₈ .NQG-X ₁₁ -C-X-H-X ₃ -H	C-X ₂ -C-X ₈ .AQG-X ₁₁ -C-X-H-X ₃ -H	UL56 N203A
C-X ₂ -C-X ₈ .NQG-X ₁₁ -C-X-H-X ₃ -H	C-X ₂ -C-X ₈ .NRG-X ₁₁ -C-X-H-X ₃ -H	UL56 Q204R
C-X ₂ -C-X ₈ .NQG-X ₁₁ -C-X-H-X ₃ -H	C-X ₂ -C-X ₈ .NQA-X ₁₁ -C-X-H-X ₃ -H	UL56 G205A

^a Amino acids changed in the mutants are in bold

MATERIALS AND METHODS

Identification of conserved patterns and secondary structure prediction

The pUL56 amino acid sequence of reference strain AD169 (Chee et al., 1990) was aligned with the sequences of 21 homologous proteins from other herpesviruses, as described in Table S1 (supplementary data). Alignments were performed with Clustal Omega (Ω) multiple sequence alignment (MSA) tool provided by the EMBL-EBI bioinformatics web and programmatic tools framework (Sievers et al., 2011) (McWilliam et al., 2013) (Li et al., 2015).

Cells and bacterial strains

Human fibroblasts MRC-5 (Biomerieux, France) were cultivated at 37°C in 5% CO₂ and grown in minimal essential medium (MEM) containing 10% fetal bovine serum with antimicrobials. *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 CMV laboratory strain AD169 (Borst et al., 1999).

BAC mutagenesis

To identify the crucial amino acids implied in putative LATLNDIERFL and zinc finger patterns, highly conserved residues were substituted with a serine or an alanine by « *en passant* » mutagenesis, a two-step markerless Red recombination system for BAC mutagenesis in *E. coli* strain GS1783. Single *UL56* mutations were introduced into an EGFP-expressing HCMV-BAC (Borst et al., 1999) to generate several mutants as described in Table 1. Primers used for mutagenesis are described in Tables S2 and S3 (supplementary data). Presence of mutations in *UL56* gene of each virus was confirmed by sequencing prior to transfection. We previously showed that the « *en passant* » mutagenesis does not introduced other mutations that could have a negative impact on viral replication (Ligat et al., 2017). The mutant Q204R was tested in the same experiments as positive control (Krosky et al., 1998).

Reconstitution of virus mutants

The impact of all mutations on viral growth was assessed using transfection of mutated HCMV-BAC into human fibroblasts MRC-5 (Biomerieux, France) using of liposomal reagent Transfast™ (Promega, USA) following manufacturer's instructions.

Plaque assays and growth curve analysis

To estimate the impact of each mutation on viral fitness, we inoculated viral recombinant strains and AD169-EGFP in 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. Curves represent the average of three independent experiments. For statistical analysis, the Mann-Whitney test was applied. * $p < 0.05$.

Viral immediate early and late protein expression

A transfection of mutated HCMV-BAC into human fibroblasts MRC-5 using liposomal reagent Transfast™ (Promega, USA) 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, United Kingdom) proteins in transfected cells.

RESULTS

Identification of a LATLNDIERFL pattern into pUL56, characteristic of the LAGLIDADG homing endonuclease

By proteins sequences comparison among 21 homologous proteins of pUL56 from other herpesviruses, we detected an amino acids sequence characteristic of the LAGLIDADG pattern of the LAGLIDADG homing endonuclease family located in the N-terminal part of pUL56 (Fig. 1). This region of the pUL56 protein is a well-conserved sequence, particularly for physico-chemical characteristics of amino acids. However, even within LAGLIDADG homing endonucleases, this characteristic pattern is not highly conserved and only the second aspartic acid is conserved among LAGLIDADG homing endonuclease (Grishin et al., 2010).

	120	130	140	150
ALPHAHERPES				
HSV_1	CPYHQVRRLD	TYGGT--VH	MELCFLHD	VENFLKQLNYCHLITPSR
HSV_2	CPYHQQIRLQ	TYGGD--VR	MELCFLHD	VENFLKQLNYCHLITPPS
CeHV_1	CPYHQPIRLE	TYGGC--VD	MELCFLHD	VENFLKQLNYCHLITPPR
CeHV_2	CPYHVETEL	RAYGDVR-V	TKQLSTV	NDAENLLKQVNYIHAVVPEA
EHV_1	CEYHVRVHL	D	TYGGP--ID	AEVQFLHDAENFLKQLNYCHLITGFE
GaHV_3	CPYHEVVEL	D	TYGGS--VR	TEIKFLHDVENILKQLNYCHLIVKAG
MeHV_1	CPYHVVAEL	D	TYGGP--VT	TEIKFLHDVENVLKQLNYCHLIINSR
HHV_3	CQYHHEL	SLTTYGGY--	VSSEIQFL	HDIENFLKQLNYCYIITSSR
SUID	CRFHARVAL	D	TYGGR--VE	TQLFLHDAENLLKQLNYCHLITPHA
GaHV_1	CPLHAEVQL	QLYGMSSI	ISKELVL	INDVENFMKQLNYCHC
GaHV_2	CPLHAEVQL	QLYGMSSI	ISKELVL	INDVENFMKQLNYCHC
BETAHERPES				
AD169	CDRHHTVEL	QFTDNVR-F	SVS	LATLNDIERFL CKMNYVYGILAPE
HHV_6_B	CAEHL	SINISL	NNGVE-F	IVQLSTLNDIEQLISKINSVYALLLPQ
HHV_6_A_GS	CAEHL	SINISL	NNGVE-F	IVQLSTLNDIEQLISKINSVYALLLPQ
CCMV	CNRHESIT	ITFAPELA-	LTIDL	LATLNDVERLLCKINCVYGAVDAS
RhCMV	CDRHHTVEL	TFTDNVK-F	SVTL	LATLNDIERFLCKMNYVYAILLSP
MCMV	CNRHESIT	I-TFAPELA	L	TIDLATLNDVERLLCKINCVYGAVDAS
RCMV	CP--ESV	TLVFAPGLH-	LTIE	LATLNDIERLLCKINCVYGALDRT
GAMMAHERPES				
HHV_8	ATSNRSV	RNFYGNWA-	LELKL	SLINDVEIFFKRLSSVFYICIGSG
HHV_4_1	RTPSVAYS	VVEFYGGHK-	VDVSL	CLINDIEILMKRINSVFYCMSHT
HHV_4_2	RTPSVAYS	VVEFYGGHK-	VDVSL	CLINDIEILMKRINSVFYCMSHT

Figure 1: Sequences alignment of conserved region from 21 herpesviruses belonging to alpha, beta and gamma sub-families of herpesviruses. Sequence numbering is consistent with that of the HCMV reference strain AD169 residues. Key residues involved in the formation of the putative LATLNDIERFL of pUL56 pattern are shown as white letters on a black background.

Several amino acids of putative pUL56 LATLNDIERFL pattern are essential for viral replication

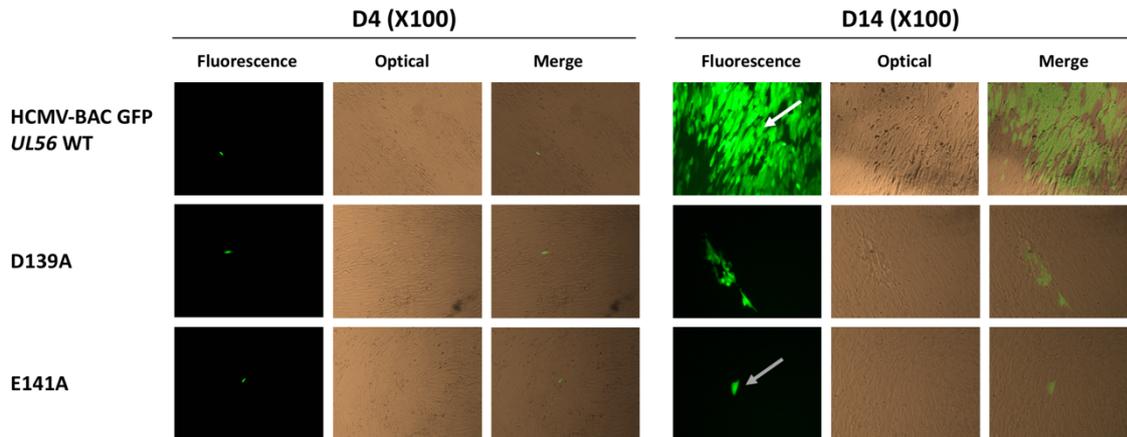
To identify amino acid of putative ₁₃₄LATLNDIERFL₁₄₄ pattern implied in dimerization and or endonuclease activity we produced by « *en passant* » mutagenesis several recombinant EGFP-virus.

First, we mutated two conserved negatively amino acids (D139, E141) predicted as involved in chelation of positively charged ions (mostly calcium or magnesium) essential for DNA cleavage. Contrary to the substitution of D139, E141 mutation impaired viral replication (Fig. 2 A). However, growth curves for D139A mutated strains was not similar to that of wild-type HCMV-BAC showing that D139A mutation had an impact on HCMV replication capacity (Fig. 2 B). Indeed, this mutation reduces the capacity of the virus to produce infectious particles.

Leucine-zipper through conserved hydrophobic amino acid (leucine and isoleucine) are likely to be involved in protein dimerization as LAGLIDADG homing endonuclease. Replacement of these amino acids with alanine will probably destroy putative dimerization of pUL56. Indeed, mutations of single residues leucine or isoleucine (L134, L137, I140, L144) forming a hypothetical pattern leucine zipper reduce the capacity of the virus to produce infectious particles (data not show) and reduce the viral fitness (Fig. 3.A). Combinations of only two leucine and isoleucine mutations in this pattern impaired viral replication and propagation in cell-culture (Fig. 3.B).

To check if these amino acids substitutions may disrupt another step of the 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 (IEA) and late (gB) viral genes were detected indicating that substitutions have no impact on viral gene expression (Fig. 6).

A



B

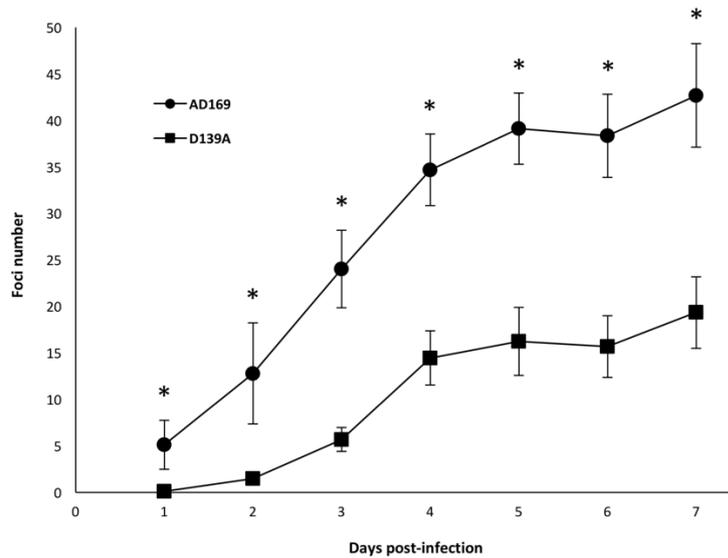
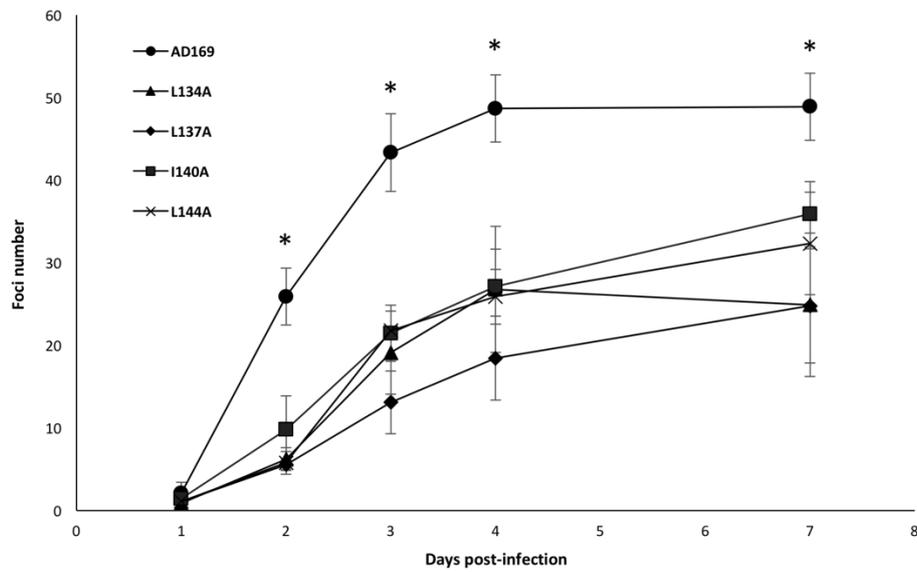


Figure 2: Effect of the terminase pUL56 D139A and E141A mutations on viral growth. A. Plaque formation assay using transfection of HCMV-BAC AD169 and recombinant virus strains (amino acid probably involved in nuclease activity) in MRC-5 cells at day 4 and day 14. Green fluorescent foci (white arrow) were observed with the wild-type HCMV-BAC GFP and the D139A mutation. Single infected cells (grey arrow) were observed with the E141A mutation. B. Growth curves of the recombinant virus strains HCMV-BAC *UL56* D139A in comparison to the parental strain HCMV-BAC AD169. Fluorescent foci were counted daily from day 1 to day 7. Curves represent the average of three independent experiments. *, $p < 0.05$ (Mann-Whitney test).

A



B

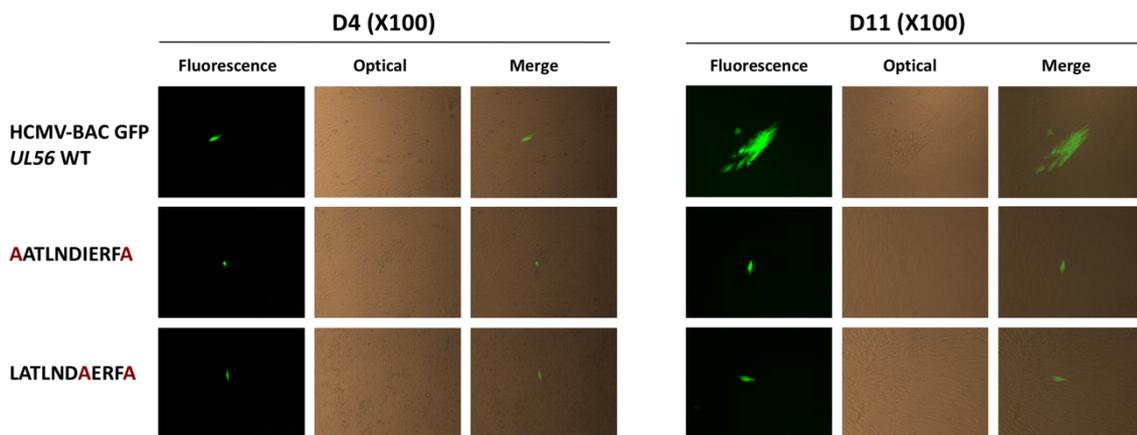


Figure 3: Effect of the terminase pUL56 mutations within the putative leucine-zipper on viral growth. A. Growth curves of the recombinant virus strains HCMV-BAC *UL56* L134A, L137A, I140A and L144A in comparison to the parental strain HCMV-BAC AD169. Fluorescent foci were counted daily from day 1 to day 7. Curves are the average of three independent experiments. *, $p < 0.05$ (Mann-Whitney test). B. Plaque formation assay using transfection of HCMV-BAC AD169 and recombinant virus strain (amino acid probably involved in leucine zipper pattern) in MRC-5 cells.

The putative zinc finger pattern of pUL56 N-terminal is required for viral replication

To investigate the putative DNA binding pattern of pUL56 previously described in three different ways C191-X₂-C194-X₂₂-C217-X-H219 (CCCH), C191-X₂-C194-X₂₂-C217-X₅-H223 (CCCH), and C191-X₂-C194-X₂₄-H219-X₃-H223 (CCHH) (Fig. 4) (Champier et al., 2008), we produced by « *en passant* » mutagenesis eight recombinant EGFP-viruses (C191S, C194S, C217S, H219A, H223A, N203A, Q204R, G205A).

Cysteines 191, 194 and 217, histidine 219 and 223 were selected for mutagenesis because these residues were predicted as involved in chelation of zinc ion essential for zinc-finger structuration. Residues N203 and G205 were selected for mutagenesis because they are perfectly conserved among all the 20 herpesvirus homologues of pUL56 and flanking the previously described Q204R resistance mutation. The mutant Q204R was tested in the same experiments as positive control.

Eleven days after the transfection of human fibroblasts, we observed no cytopathic effect for the subsequent mutations C191S, C194S, C217S, H219A and N203A, located within the putative metal-binding motif (Fig. 5.A). We found that most missense mutations dramatically impaired viral replication and virions production. In contrast, two mutations H223A and G205A did not alter viral replication (Fig. 5.A). Growth curves for H223A mutated strains was similar to that of wild-type HCMV-BAC showing that H223 mutation had no impact on HCMV replication capacity (Fig. 5.B).

Like for LATLNDIERFL pattern experiments, expression of immediate early (IEA) and late (gB) viral genes were detected indicating that tested substitutions have no impact on viral gene expression (Fig. 6).

A

	180	190	200	210	220	230																																															
ALPHAHERPES																																																					
HSV_1	V	P	P	E	L	S	D	P	S	H	P	C	A	V	C	F	E	E	L	C	V	T	A	N	Q	G	A	T	I	A	R	R	L	A	D	R	I	C	N	H	V	T	Q	Q	A	Q	V	R	L	D	A	N	E
HSV_2	V	P	P	E	L	S	D	P	S	H	P	C	A	V	C	F	E	E	L	C	V	T	A	N	Q	G	A	T	I	A	R	R	L	A	D	R	I	C	N	H	V	T	Q	Q	A	Q	V	R	L	D	A	N	E
CeHV_1	V	P	P	E	I	S	D	P	S	H	P	C	A	V	C	F	E	E	L	C	V	T	A	N	Q	G	A	T	I	A	R	R	L	A	D	R	I	C	N	H	V	T	Q	Q	A	Q	V	R	L	D	D	N	E
CeHV_2	V	P	P	E	I	S	D	P	S	H	P	C	A	V	C	F	E	E	L	C	V	T	A	N	Q	G	A	T	V	A	R	R	L	A	D	R	I	C	N	H	V	T	Q	Q	A	Q	V	R	L	D	D	N	E
EHV_1	V	P	P	E	L	C	D	P	T	H	P	C	S	V	C	F	E	E	L	C	V	T	A	N	Q	G	E	A	V	H	R	R	L	L	E	C	T	D	H	I	T	R	Q	M	A	V	R	V	A	N	I	D	
GaHV_3	V	S	P	E	L	C	D	P	S	Q	P	C	S	V	C	F	E	E	L	C	V	T	A	N	S	G	D	S	A	H	K	R	I	I	G	K	I	C	N	H	V	T	K	Q	I	V	L	R	V	H	P	D	
MeHV_1	V	P	P	E	L	Y	D	P	S	Q	P	C	S	V	C	F	E	E	L	C	V	T	A	N	S	G	D	S	A	H	K	R	I	V	G	K	M	C	D	H	V	T	K	Q	M	I	L	R	V	D	P	D	
HHV_3	P	P	V	E	L	F	D	P	A	H	P	C	A	I	C	F	E	E	L	C	I	T	A	N	Q	G	E	T	L	H	R	R	L	L	G	C	I	C	D	H	V	T	K	Q	V	R	V	N	V	D	V	D	
SUID	V	P	P	E	L	Y	D	P	A	Q	P	C	A	V	C	F	E	E	L	C	V	T	A	N	Q	G	E	A	T	H	R	R	L	L	G	C	V	C	D	H	L	T	R	Q	L	A	V	R	V	D	P	E	D
GaHV_1	A	A	P	D	T	Y	D	H	G	Q	P	C	Y	V	C	L	E	E	L	S	V	T	A	N	Q	G	E	T	I	Y	R	R	L	G	Y	K	I	C	D	H	L	T	R	Q	F	P	V	N	V	S	T	D	
GaHV_2	A	A	P	D	T	Y	D	H	G	Q	P	C	Y	V	C	L	E	E	L	S	V	T	A	N	Q	G	E	T	I	Y	R	R	L	G	Y	K	I	C	D	H	L	T	R	Q	F	P	V	N	V	S	T	D	
BETAHERPES																																																					
AD169	A	R	Q	E	V	Y	V	E	G	T	T	C	A	Q	C	Y	E	E	L	T	I	I	P	N	Q	G	R	S	L	N	K	R	L	Q	G	L	L	C	N	H	I	A	V	H	R	P	S	-	S	Q	S	D	V
HHV_6_B	A	K	P	E	S	Y	L	E	T	K	T	C	M	K	C	Y	E	E	L	T	L	T	P	N	Q	G	K	S	L	R	R	L	H	G	K	F	C	N	H	L	T	E	Q	K	A	F	-	F	N	I	E	K	
HHV_6_A_GS	A	K	P	E	S	Y	L	E	T	K	T	C	M	K	C	Y	E	E	L	T	L	T	P	N	Q	G	K	S	L	R	R	L	H	G	K	F	C	N	H	L	T	E	Q	K	A	F	-	F	N	I	E	K	
CCMV	A	R	Q	E	A	Y	V	E	G	T	T	C	A	Q	C	Y	E	E	L	T	I	I	P	N	Q	G	R	S	L	N	K	R	L	Q	G	L	L	C	N	H	I	A	V	H	R	P	S	-	S	Q	S	D	V
RhCMV	A	C	Q	E	A	Y	V	E	G	T	T	C	A	Q	C	Y	E	E	L	T	I	I	P	N	Q	G	R	S	L	N	K	R	L	Q	G	L	L	C	N	H	I	V	V	H	R	P	S	-	S	Q	C	D	V
MCMV	A	G	P	E	I	Y	R	E	T	V	T	C	F	Q	C	Y	E	E	L	M	A	V	P	N	Q	G	R	S	I	N	R	R	M	Q	G	L	L	C	D	H	I	T	K	K	V	-	V	Q	L	D	M		
RCMV	A	G	P	E	T	Y	R	E	T	S	T	C	Y	Q	C	Y	E	E	L	M	A	V	P	N	Q	G	R	S	I	N	R	R	I	E	G	L	L	C	D	H	V	T	V	K	K	V	-	V	Q	L	D	T	
GAMMAHERPES																																																					
HHV_8	P	G	P	D	L	Y	V	S	N	L	P	C	L	E	L	Q	E	V	C	L	T	P	N	Q	G	T	S	L	Q	A	M	L	P	D	T	A	C	S	H	I	C	T	P	A	C	G	E	P	V	R	G	L	
HHV_4_1	P	D	P	R	L	Y	I	T	S	V	P	C	W	R	C	V	G	E	L	M	V	L	P	N	H	G	N	P	S	T	A	E	G	T	H	V	S	C	N	H	L	A	V	P	V	N	P	E	P	V	S	G	L
HHV_4_2	P	D	P	R	L	Y	I	T	S	V	P	C	W	R	C	V	G	E	L	M	V	L	P	N	H	G	N	P	S	T	A	E	G	T	H	V	S	C	N	H	L	A	V	P	V	N	P	E	P	V	S	G	L

B

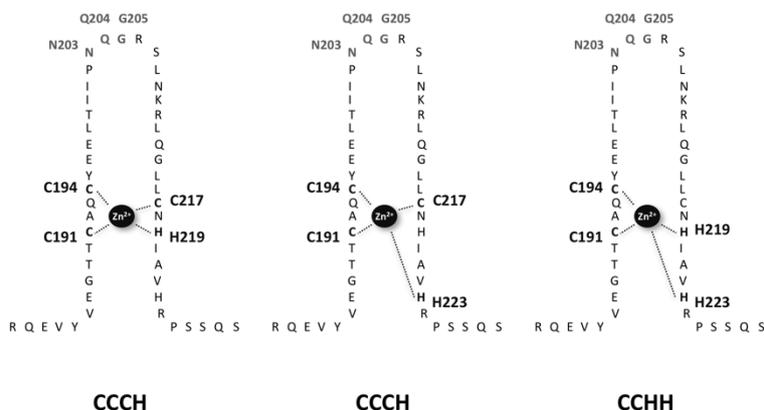
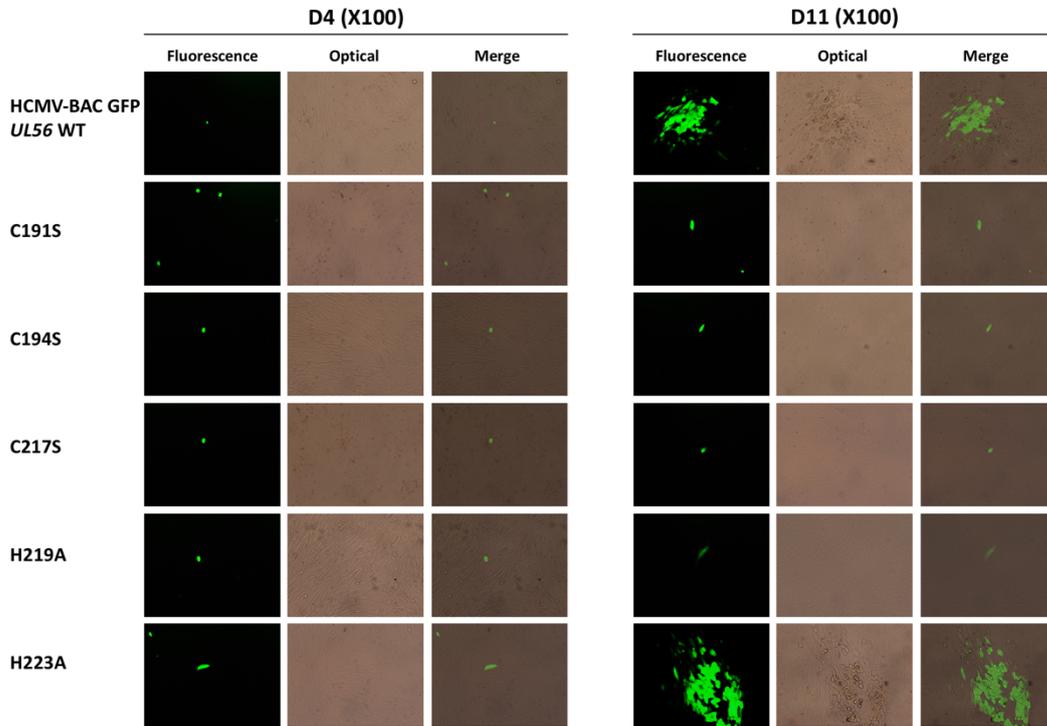
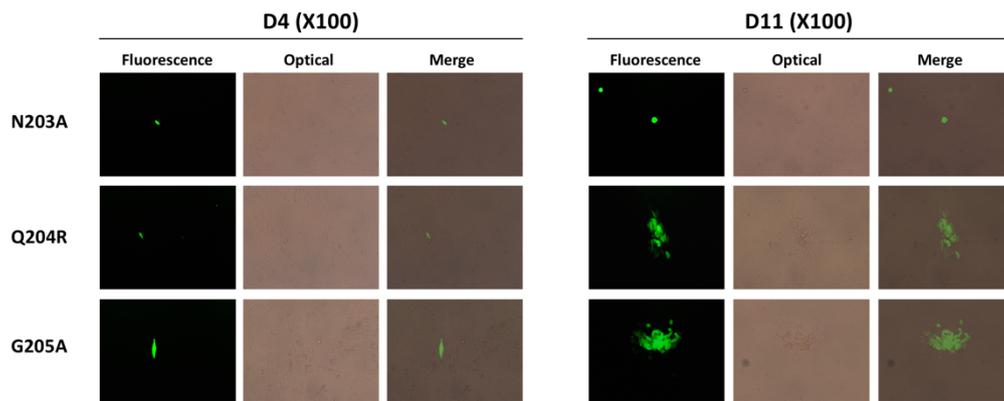


Figure 4: Conserved zinc finger region and amino acids in terminase pUL56. A. Sequences alignment of conserved regions IV from 21 herpesviruses and residues involved in metal-binding site (Champier et al., 2008). Sequence numbering is consistent with that of the HCMV reference strain AD169 residues. Key residues involved in the formation of the zinc-finger motif are shown as white letters on a black background. B. Three different representations of the putative zinc finger motif: CX₂CX₂₂CX_H (CCCH zinc finger), CX₂CX₂₄HX₃H (CCHH zinc finger), and CX₂CX₂₂CX₅H (CCCH zinc finger). Amino acids implicated in the motif are highlighted: (C191, C194, C217 and H219), (C191, C194, C219 and H223) and (C191, C194, C217 and H223), respectively.

A



B



C

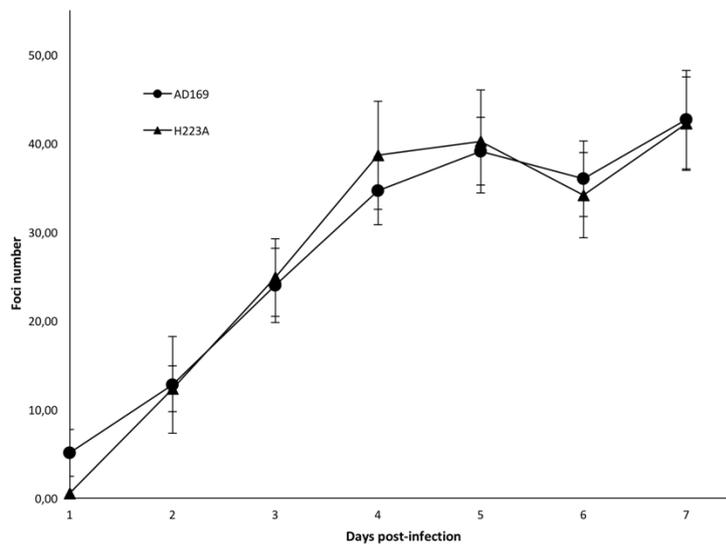


Figure 5: Effect of the terminase pUL56 mutations within the putative zinc finger on viral growth.

A. Plaque formation assay using transfection of HCMV-BAC AD169 and recombinant virus strain (amino acid probably involved in zinc chelation of putative zinc finger pattern) in MRC-5 cells. B. Plaque formation assay using transfection of HCMV BAC AD169 and recombinant virus strains (amino acids in the loop of putative zinc finger pattern) in MRC-5 cells. C. Growth curves of the recombinant virus strains HCMV-BAC *UL56* H223A in comparison to the parental strain HCMV-BAC AD169. Fluorescent foci were counted daily from day 1 to day 7. Curves are the average of three independent experiments. *, $p < 0.05$ (Mann-Whitney test).

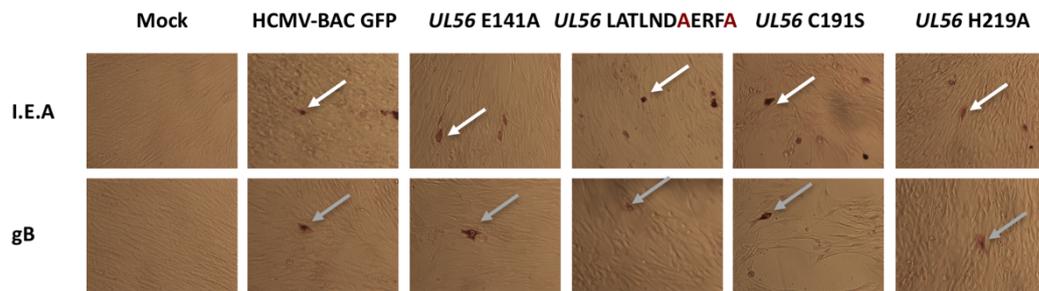


Figure 6: pUL56 are not required for viral late gene expression. MRC-5 were transfected with HCMV-BAC WT or the mutants. Five days after transfection, immunostaining was performed for early (I.E.A) (white arrow) and late (gB) (grey arrow) viral proteins.

DISCUSSION

Nucleosides analogues as ganciclovir or cidofovir target the viral DNA polymerase of cytomegalovirus. They are a few problems associated with these treatments such as emergence of resistance in immunosuppressed individuals and toxicity. Thus, they are clinical need to develop new therapies against novel targets to treat HCMV infection.

The process of herpesvirus DNA packaging requires the involvement of terminases. The functional packaging holocomplex is a hetero-oligomer composed of pUL56, pUL89 and pUL51 proteins. HCMV packaging initiates when a packaging signal called « *pac* » sequence is recognized on concatemeric DNA by the viral terminase complex. The DNA/terminase complex then binds to an empty procapsid at its unique portal vertex, embedded into the preformed procapsid. DNA is then translocated through the portal vertex. A second site-specific cleavage occurs to terminate packaging when a unit length genome has been translocated.

Sequence alignment showed a strong homology between pUL56 and LAGLIDADG homing endonucleases with a zing-finger and a ${}_{134}\text{LATLNDIERFL}_{144}$ patterns located in pUL56 N-terminal region. As pUL56, LAGLIDADG Homing endonucleases recognize DNA molecules and are involved in DNA nuclease activity (Bogner et al., 1998) (Silva et al., 1999) (Chevalier et al., 2001).

To investigate the putative ${}_{134}\text{LATLNDIERFL}_{144}$ and DNA binding pattern of pUL56, we produced by « *en passant* » mutagenesis recombinant EGFP-viruses. We found several residues crucial for viral replication within the LATLNDIERFL and the zinc-finger patterns of pUL56. Interestingly, although our recombinant L134A reduce the viral fitness, the variant L134V is sensitive to letermovir with no impact on viral fitness, thus representing a natural polymorphism (Lischka et al., 2016). Both aliphatic amino acids leucine and valine have a longer carbon chain than alanine. Therefore, L134A mutation may alter the dimerization of pUL56 through the ${}_{134}\text{LATLNDIERFL}_{144}$ pattern and so decrease the efficacy of replication, whereas this dimerization could still be possible with the L134V mutant.

According to our hypothesis and as found in LAGLIDADG homing endonucleases, we propose that two subunits of pUL56 use the ${}_{134}\text{LATLNDIERFL}_{144}$ pattern as a domain interface

where hydrophobic amino acids L134, L137, I140 and L144 dimerize. Acidic residue E141 contribute to the active sites where they participate in positively charged ions chelation (mostly calcium or magnesium) essential for DNA cleavage. Residues C191, C194, C217 and H219 are part of a cysteine-rich metal-binding motif that is essential for pUL56 function. We propose that a metal-binding motif involving the cysteine and histidine residues within the sequence C191-X₂-C194-X₂₂-C217-X-H219 is essential for pUL56 function. Side chain of polar amino acid N203 may recognize DNA through hydrogen bonds interactions. These results suggest that the cysteine-rich metal-binding motif, in the N-terminal of pUL56, may be required for both pUL56 structure and function either for DNA-binding and/or nuclease activity. Thus, the association of two ¹³⁴LATLNDIERFL₁₄₄ patterns and two zinc-fingers could constitute the pUL56 DNA-binding and cleavage site (Fig. 7).

Interestingly, the ¹³⁴LATLNDIERFL₁₄₄ and zinc-finger patterns are located near pUL56 region including mutations that facilitates letermovir resistance (Fig. 7). Thus, these motifs could be implicated in mechanism of action of letermovir.

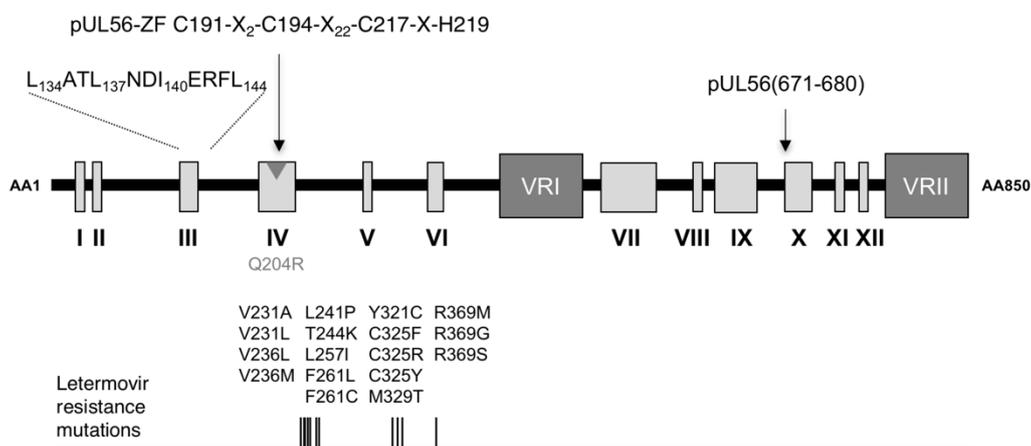


Figure 7: Proposed model of structure of HCMV terminase subunit pUL56 with the LATLNDIERFL and the zinc finger within the sequence C191-X₂-C194-X₂₂-C217-X-H219 according to Champier et al., 2008. The LATLNDIERFL and the zinc finger patterns are located near pUL56 region that includes mutations that facilitates letermovir resistance. pUL56(671-680) shown previously as binding site for pUL89 (Ligat et al., 2017).

In this study, our data confirm an essential role of pUL56 during HCMV infection and show that a LATLNDIERFL and a zinc-finger patterns in N-terminal of sequence of pUL56 are crucial for viral replication. Thus, we hypothesis that pUL56 subunit of terminase complexes belongs to the LAGLIDADG homing endonucleases. These results suggest that these patterns are a prime target for the development of new antiviral such as small molecules, peptides or antibodies and maybe allow to better understand the letermovir mechanism of action. Future studies will examine if these motifs are involved in nuclease activity to contribute to DNA maturation.

ACKNOWLEDGEMENTS

This work was granted by Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche, Conseil Régional du Limousin and Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale (Inserm). G. Ligat received financial support from the National Reference Center for Cytomegaloviruses, the CHU Limoges, and Inserm. The funders had no role in study design, data collection and interpretation, or the decision to submit the work for publication. The authors acknowledge E. Guérin and V. Tilloy from the technical facilities BISCEm, and Sandra Da Re (UMR 1092), for her review of the manuscript.

REFERENCES

- Alain, S., Hantz, S., Scieux, C., Karras, A., Mazon, M.C., Szlag, J.C., Imbert, B.M., Fillet, A.M., Gouarin, S., Mengelle, C., et al. (2004). Detection of ganciclovir resistance after valacyclovir prophylaxis in renal transplant recipients with active cytomegalovirus infection. *J. Med. Virol.* 73, 566–573.
- Andouard, D., Mazon, M.-C., Ligat, G., Couvreur, A., Pouteil-Noble, C., Cahen, R., Yasdanpanah, Y., Deering, M., Viget, N., Alain, S., et al. (2016). Contrasting effect of new HCMV pUL54 mutations on antiviral drug susceptibility: Benefits and limits of 3D analysis. *Antiviral Res.* 129, 115–119.
- Bogner, E., Radsak, K., and Stinski, M.F. (1998). The gene product of human cytomegalovirus open reading frame UL56 binds the pac motif and has specific nuclease activity. *J. Virol.* 72, 2259–2264.
- Borst, E.M., Hahn, G., Koszinowski, U.H., and Messerle, M. (1999). Cloning of the human cytomegalovirus (HCMV) genome as an infectious bacterial artificial chromosome in *Escherichia coli*: a new approach for construction of HCMV mutants. *J. Virol.* 73, 8320–8329.
- Borst, E.M., Wagner, K., Binz, A., Sodeik, B., and Messerle, M. (2008). The essential human cytomegalovirus gene UL52 is required for cleavage-packaging of the viral genome. *J. Virol.* 82, 2065–2078.
- Borst, E.M., Kleine-Albers, J., Gabaev, I., Babic, M., Wagner, K., Binz, A., Degenhardt, I., Kalesse, M., Jonjic, S., Bauerfeind, R., et al. (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.
- 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. (2016). The Essential Human Cytomegalovirus Proteins pUL77 and pUL93 Are Structural Components Necessary for Viral Genome Encapsidation. *J. Virol.* 90, 5860–5875.

- Champier, G., Couvreur, A., Hantz, S., Rametti, A., Mazon, M.-C., Bouaziz, S., Denis, F., and Alain, S. (2008). Putative functional domains of human cytomegalovirus pUL56 involved in dimerization and benzimidazole D-ribonucleoside activity. *Antivir. Ther.* 13, 643–654.
- Chee, M.S., Bankier, A.T., Beck, S., Bohni, R., Brown, C.M., Cerny, R., Horsnell, T., Hutchison, C.A., Kouzarides, T., and 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.
- 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. (2014). Letermovir for cytomegalovirus prophylaxis in hematopoietic-cell transplantation. *N. Engl. J. Med.* 370, 1781–1789.
- Chevalier, B.S., Monnat, R.J., and Stoddard, B.L. (2001). The homing endonuclease I-Crel uses three metals, one of which is shared between the two active sites. *Nat. Struct. Biol.* 8, 312–316.
- Chou, S. (2015). Rapid In Vitro Evolution of Human Cytomegalovirus UL56 Mutations That Confer Letermovir Resistance. *Antimicrob. Agents Chemother.* 59, 6588–6593.
- Chou, S. (2017). Comparison of Cytomegalovirus Terminase Gene Mutations Selected after Exposure to Three Distinct Inhibitor Compounds. *Antimicrob. Agents Chemother.*
- DeRussy, B.M., and Tandon, R. (2015). Human cytomegalovirus pUL93 is required for viral genome cleavage and packaging. *J. Virol.*
- Goldner, T., Hewlett, G., Ettischer, N., Ruebsamen-Schaeff, H., Zimmermann, H., and 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.
- Grishin, A., Fonfara, I., Alexeevski, A., Spirin, S., Zanevina, O., Karyagina, A., Alexeyevsky, D., and Wende, W. (2010). Identification of conserved features of LAGLIDADG homing endonucleases. *J. Bioinform. Comput. Biol.* 8, 453–469.
- Hantz, S., Garnier-Geoffroy, F., Mazon, M.-C., Garrigue, I., Merville, P., Mengelle, C., Rostaing, L., Saint Marcoux, F., Essig, M., Rerolle, J.-P., et al. (2010). Drug-resistant

cytomegalovirus in transplant recipients: a French cohort study. *J. Antimicrob. Chemother.* 65, 2628–2640.

Hwang, J.-S., and Bogner, E. (2002). ATPase activity of the terminase subunit pUL56 of human cytomegalovirus. *J. Biol. Chem.* 277, 6943–6948.

Krosky, P.M., Underwood, M.R., Turk, S.R., Feng, K.W., Jain, R.K., Ptak, R.G., Westerman, A.C., Biron, K.K., Townsend, L.B., and Drach, J.C. (1998). Resistance of human cytomegalovirus to benzimidazole ribonucleosides maps to two open reading frames: UL89 and UL56. *J. Virol.* 72, 4721–4728.

Li, H., Pellenz, S., Ulge, U., Stoddard, B.L., and Monnat, R.J. (2009). Generation of single-chain LAGLIDADG homing endonucleases from native homodimeric precursor proteins. *Nucleic Acids Res.* 37, 1650–1662.

Li, W., Cowley, A., Uludag, M., Gur, T., McWilliam, H., Squizzato, S., Park, Y.M., Buso, N., and Lopez, R. (2015). The EMBL-EBI bioinformatics web and programmatic tools framework. *Nucleic Acids Res.* 43, W580–W584.

Ligat, G., Jacquet, C., Chou, S., Couvreur, A., Alain, S., and Hantz, S. (2017). Identification of a short sequence in the HCMV terminase pUL56 essential for interaction with pUL89 subunit. *Sci. Rep.* 7, 8796.

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

Lischka, P., Michel, D., and Zimmermann, H. (2016). Characterization of Cytomegalovirus Breakthrough Events in a Phase 2 Prophylaxis Trial of Letemovir (AIC246, MK 8228). *J. Infect. Dis.* 213, 23–30.

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

McWilliam, H., Li, W., Uludag, M., Squizzato, S., Park, Y.M., Buso, N., Cowley, A.P., and Lopez, R. (2013). Analysis Tool Web Services from the EMBL-EBI. *Nucleic Acids Res.* 41, W597–W600.

Melendez, D.P., and Razonable, R.R. (2015). Letermovir and inhibitors of the terminase complex: a promising new class of investigational antiviral drugs against human cytomegalovirus. *Infect. Drug Resist.* 8, 269–277.

Savva, C.G.W., Holzenburg, A., and Bogner, E. (2004). Insights into the structure of human cytomegalovirus large terminase subunit pUL56. *FEBS Lett.* 563, 135–140.

Scholz, B., Rechter, S., Drach, J.C., Townsend, L.B., and Bogner, E. (2003). Identification of the ATP-binding site in the terminase subunit pUL56 of human cytomegalovirus. *Nucleic Acids Res.* 31, 1426–1433.

Sievers, F., Wilm, A., Dineen, D., Gibson, T.J., Karplus, K., Li, W., Lopez, R., McWilliam, H., Remmert, M., Söding, J., et al. (2011). Fast, scalable generation of high-quality protein multiple sequence alignments using Clustal Omega. *Mol. Syst. Biol.* 7, 539.

Silva, G.H., Dalgaard, J.Z., Belfort, M., and Van Roey, P. (1999). Crystal structure of the thermostable archaeal intron-encoded endonuclease I-Dmol. *J. Mol. Biol.* 286, 1123–1136.

Takeuchi, R., Lambert, A.R., Mak, A.N.-S., Jacoby, K., Dickson, R.J., Gloor, G.B., Scharenberg, A.M., Edgell, D.R., and Stoddard, B.L. (2011). Tapping natural reservoirs of homing endonucleases for targeted gene modification. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 108, 13077–13082.

Yang, W. (2011). Nucleases: diversity of structure, function and mechanism. *Q. Rev. Biophys.* 44, 1–93.

Identification d'un domaine au sein de pUL56 nécessaire à son interaction avec pUL89

Comme discuté dans la revue « ***Human cytomegalovirus terminase complex as an antiviral target, a close up view*** » présentée précédemment, le processus d'encapsidation nécessite plusieurs protéines telles que pUL56 ou pUL89 pour former le complexe terminase. Récemment, plusieurs études ont mis en évidence l'implication de quatre protéines supplémentaires, à savoir pUL51, pUL52, pUL77 et pUL93 (**Borst et al., 2008**) (**Borst et al., 2013**) (**Borst et al., 2016**) (**Köppen-Rung et al., 2016**) (**DeRussy and Tandon, 2015**) (**DeRussy et al., 2016**). Ce processus est notamment possible par des interactions entre les différents composants du complexe terminase. Bien que l'association entre pUL56 et pUL89 ait été rapportée il y a quelques années, le domaine précis et les résidus de pUL56 impliqués dans cette interaction sont encore inconnue. Néanmoins, des expériences de co-immunoprécipitation ont pu mettre en évidence une interaction entre le segment C-terminale de pUL56 et pUL89 (**Hwang and Bogner, 2002**) (**Thoma et al., 2006**).

Un alignement des séquences de pUL56 avec 20 homologues d'herpès virus a permis de mettre en évidence le fragment ${}_{671}\text{WMVVKYMGFF}_{680}$, bien conservé au sein des béta-herpès virus. Sa structure secondaire est prédite comme une hélice alpha. Des études antérieures ont démontré que le peptide pUL89(580-600) impliqué dans l'interface pUL56-pUL89 (**Thoma et al., 2006**) adopte une structure secondaire en hélice alpha (**Couvreux et al., 2010**) (**Nadal et al., 2010**). Par ailleurs, pUL56(671-680) se trouve dans la partie C-terminale précédemment décrite comme étant suffisante pour l'interaction avec pUL89 (**Hwang and Bogner, 2002**) (**Thoma et al., 2006**). De façon intéressante, ce motif appartient à la région de pUL56 portant le site de liaison de l'ATP. De plus, pUL89(580-600) se trouve dans le domaine endonucléase de pUL89 (**Nadal et al., 2010**). Les deux activités, ATPase de pUL56 d'une part et nuclease de pUL89, d'autre part, dépendent de l'association entre les deux sous-unités terminase (**Hwang and Bogner, 2002**) (**Scheffczik et al., 2002**). L'ensemble de ces observations font du pUL56 (671-680) un bon candidat pour interagir avec pUL89.

Ainsi, et afin d'évaluer l'importance de ce fragment pour la réplication du CMVH, nous avons produit des BAC CMVH portant la délétion du segment ou des mutations ponctuelles. Contrairement au BAC CMVH de type sauvage, onze jours après la transfection en fibroblastes

humains (MRC-5), nous n'avons observé aucun foyer pour le mutant présentant la délétion de la séquence $_{671}\text{WMVVKYMGGFF}_{680}$. Les BAC CMVH recombinants possédant une seule ou une combinaison de mutations (résidus W671A, Y676A, F679A et F680A) ne produisent pas de virions infectieux. Ces acides aminés ont été choisis parce qu'ils sont parfaitement conservés ou remplacés par un autre acide aminé aromatique pour les moins conservés.

Les cellules HEK293 ont été transfectées avec les plasmides d'expression codant les protéines 3xHA-pUL56 et 6xHis-pUL89 (respectivement SC784, pCI-neo His-89). L'implication du fragment $_{671}\text{WMVVKYMGGFF}_{680}$ dans l'interaction avec pUL89 a été évaluée par l'utilisation de la technologie Alpha (PerlinElmer, USA). Cette technologie est basée sur la proximité physique de deux billes, donneuses et acceptrices conjuguées à des anticorps-protéines. Elle permet notamment d'étudier les interactions moléculaires au format microplaque. Lors d'une interaction spécifique entre deux protéines, un singulet d'oxygène diffuse de la bille donneuse à la bille acceptrice, ce qui provoque une émission de lumière à 615 nm. Ces tests sont réalisés sur un lecteur de microplaques multi-mode Enspire® (PerkinElmer, USA). La première étape consistait à vérifier l'interaction entre pUL56-WT et pUL89-WT, comme contrôle positif. Les tests Alpha avec les protéines 3xHA-pUL56 et 6xHis-pUL89 entraînent la production de plus de 9 000 unités relatives de lumière, deux fois plus que les témoins négatifs (3xHA-pUL56 ou 6xHis-pUL89). La délétion du fragment pUL56(671-680) a diminué significativement le signal d'interaction de 50%. Ces données suggèrent que $_{671}\text{WMVVKYMGGFF}_{680}$ est nécessaire pour l'interaction avec pUL89.

La compréhension des mécanismes d'interactions entre les différentes sous unités d'un complexe pourrait servir de point de départ pour le développement de nouveaux antiviraux comme des peptides ou de petites molécules. Nous pourrions notamment envisager de tester des peptides comprenant la séquence WMVVKYMGGFF qui serviraient de leurre moléculaire en interagissant avec pUL89 et par conséquent empêchant l'interaction avec pUL56.

*Ces résultats ont fait l'objet d'une demande de dépôt de brevet auprès de l'Office Européen des Brevets et d'un troisième article paru dans « **Scientific Reports** » :*

Antibodies and peptides to treat HCMV related diseases

Déclaration d'invention déposée auprès de l'Office Européen des Brevets

Numéro de dépôt : EP17305987.4

Date de dépôt : 24-07-2017

Identification of a short sequence in the HCMV terminase pUL56 essential for interaction with pUL89 subunit

Ligat, G., Jacquet, C., Chou, S., Couvreur, A., Alain, S., Hantz, S.

(2017) Sci. Rep. 7, 8796.

(Les données complémentaires de l'article sont données en annexes)

SCIENTIFIC REPORTS

OPEN

Identification of a short sequence in the HCMV terminase pUL56 essential for interaction with pUL89 subunit

Received: 31 May 2017

Accepted: 26 July 2017

Published online: 18 August 2017

G. Ligat^{1,2}, C. Jacquet^{1,2}, S. Chou³, A. Couvreur¹, S. Alain^{1,2} & S. Hantz^{1,2}

The human cytomegalovirus (HCMV) terminase complex consists of several components acting together to cleave viral DNA into unit length genomes and translocate them into capsids, a critical process in the production of infectious virions subsequent to DNA replication. Previous studies suggest that the carboxyl-terminal portion of the pUL56 subunit interacts with the pUL89 subunit. However, the specific interacting residues of pUL56 remain unknown. We identified a conserved sequence in the C-terminal moiety of pUL56 (₆₇₁WMVVKYMGFF₆₈₀). Overrepresentation of conserved aromatic amino acids through 20 herpesviruses homologues of pUL56 suggests an involvement of this short peptide into the interaction between the larger pUL56 terminase subunit and the smaller pUL89 subunit. Use of Alpha technology highlighted an interaction between pUL56 and pUL89 driven through the peptide ₆₇₁WMVVKYMGFF₆₈₀. A deletion of these residues blocks viral replication. We hypothesize that it is the consequence of the disruption of the pUL56-pUL89 interaction. These results show that this motif is essential for HCMV replication and could be a target for development of new small antiviral drugs or peptidomimetics.

Human cytomegalovirus (HCMV), a beta herpesvirus, can cause serious diseases in immunocompromised patients. Current antiviral inhibitors (ganciclovir, cidofovir and foscarnet) all target the viral DNA polymerase. They have adverse effects and prolonged treatment can select for drug resistance mutations either in the viral polymerase pUL54, the kinase pUL97 or both of them^{1,2}. Thus, we need new drugs targeting others stages of replication. The terminase complex is highly specific for HCMV, has no counterpart in the human organism, and thus represents a target of choice for new antivirals development. This has been confirmed by the recent development of letermovir in the transplant setting^{3,4}.

DNA packaging process requires several proteins such as pUL56 and pUL89, the large and small terminase subunits, respectively. Recently, four additional proteins were shown to be also implicated in this process, namely, pUL51, pUL52, pUL77, pUL93⁵⁻¹⁰. This process is driven by specific interactions of protein-DNA and protein-protein to cleave and package unit length genomic DNA into an empty capsid.

Evidence suggests that the large subunit pUL56 has a crucial role in DNA cleavage/packaging, containing many of the functional sites required for this process like interaction with the portal protein pUL104, endonuclease activity, and more interestingly an ATP-binding site (amino acids 709 to 723)¹¹. Although the association between pUL56 and pUL89 has already been reported, the residues of pUL56 involved in the terminase complex integrity are still unknown^{12,13}. Nevertheless, co-immunoprecipitation experiments showing an interaction between the C-terminal half of pUL56 (pUL56-Cter) and pUL89 were confirmed by other results^{2,13}.

Because knowledge of terminase functional and interaction domains is important both for the development of drugs targeting the DNA packaging stage and for the improvement of existing ones such as letermovir, the aim of the current study is to identify a minimum peptide of pUL56 with a putative key role in its interaction with pUL89. Sequence alignments encouraged us to focus on the putative involvement of one part of the pUL56

¹Université Limoges, INSERM, CHU Limoges, UMR 1092, Limoges, France. ²CHU Limoges, Laboratoire de Bactériologie-Virologie-Hygiène, National Reference Center for Cytomegaloviruses (NRC), Limoges, France.

³Division of Infectious Diseases, Oregon Health and Science University, Portland, Oregon, USA and Research Service, VA Portland Health Care System, Portland, Oregon, USA. Correspondence and requests for materials should be addressed to S.H. (email: sebastien.hantz@unilim.fr)

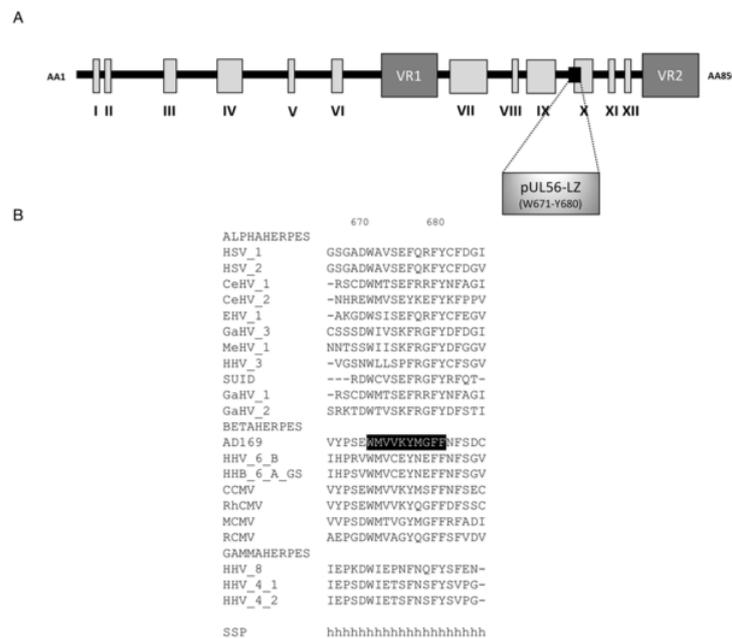


Figure 1. (A) Structure of HCMV terminase subunit pUL56 with a putative leucine zipper pattern annotated as pUL56-LZ²². (B) Sequences alignment of conserved regions from 21 herpesviruses. Sequence numbering is consistent with that of AD169 residues. Key residues are highlighted as white letters on a black background. SSP: Secondary structure prediction of pUL56-LZ (h = α helix).

sequence into its interface with pUL89. BAC mutagenesis and Alpha technology using purified proteins subsequently validated that the aromatic rich peptide ⁶⁷¹WMVVKYMGFF₆₈₀ pUL56(671-680) in the C-terminal of pUL56 is involved in interaction with pUL89. These results could contribute for development of new antiviral drugs, peptides or antibodies against HCMV.

Results

A putative conserved protein interface in pUL56 subunit. Selection of a potent pUL56 fragment for pUL89 interaction was supported by three hints. First, based on the sequences alignment of pUL56 with 20 herpesviruses homologues, the peptide ⁶⁷¹WMVVKYMGFF₆₈₀ pUL56(671-680) seems to be broadly conserved in betaherpesviruses proteins, which supported a major role either in function or structure of pUL56. Secondly, as shown in Fig. 1, its secondary structure is predicted as an alpha helix. Previous studies demonstrated that the peptide pUL89(580-600) implicated in the pUL56-pUL89 interface¹³ adopts an alpha helix secondary structure^{14, 15}. Moreover, wide protein-protein interfaces analyses revealed a preferential interaction of an helix of one protein with one of its counterpart^{16, 17}.

Thirdly, pUL56(671-680) is within the C-terminal part previously described to be sufficient for interaction with pUL89¹². Interestingly, this motif belongs to the pUL56 region carrying the ATP binding site. As a parallel, pUL89(580-600) is enclosed into the endonuclease domain of pUL89¹⁵. Both activities, ATPase of pUL56 on the one hand and nuclease of pUL89 on the other hand are dependent on the association between the two terminase subunits^{12, 18}. Taken together, these observations make pUL56(671-680) a good candidate to interact with pUL89.

A deletion or targeted mutations of ⁶⁷¹WMVVKYMGFF₆₈₀ pUL56 domain affects viral replication in MRC-5 cells. To evaluate the importance of the pUL56 predicted domain for viral replication, we produced by "en passant" mutagenesis recombinant EGFP-virus with complete deletion of *UL56*(671-680) or point mutations in this sequence. Analysis of HCMV genome confirmed that *UL56* sequence does not encode a gene on the other strand¹⁹. Thus, mutations in the virus are silent on the other strand and thus cannot impact the function of another gene expressed from the other strand. To ensure that no other mutations that could have a negative impact on viral replication was introduced in the BAC backbone during the manipulations, we performed NGS sequencing on both the original BAC and the mutants. The deletion was found in 100% of the mutants BAC sequences whereas other SNPs were located in genes non essential for viral replication and represent less than 30% of the sequences both in the original BAC and in the mutants.

Unlike the wild-type HCMV-BAC, eleven days after the transfection of human fibroblasts (MRC-5 cells), we observed no foci of cytopathic effect for the mutant which has a deletion of ⁶⁷¹WMVVKYMGFF₆₈₀ sequence (Fig. 2). This deletion dramatically impaired viral replication and propagation in cell-culture. In the same way, recombinant EGFP-viruses with a single or a combination of mutations among W671A, Y676A, F679A and F680A do not produce progeny virion as well. These residues were selected for mutagenesis because they are

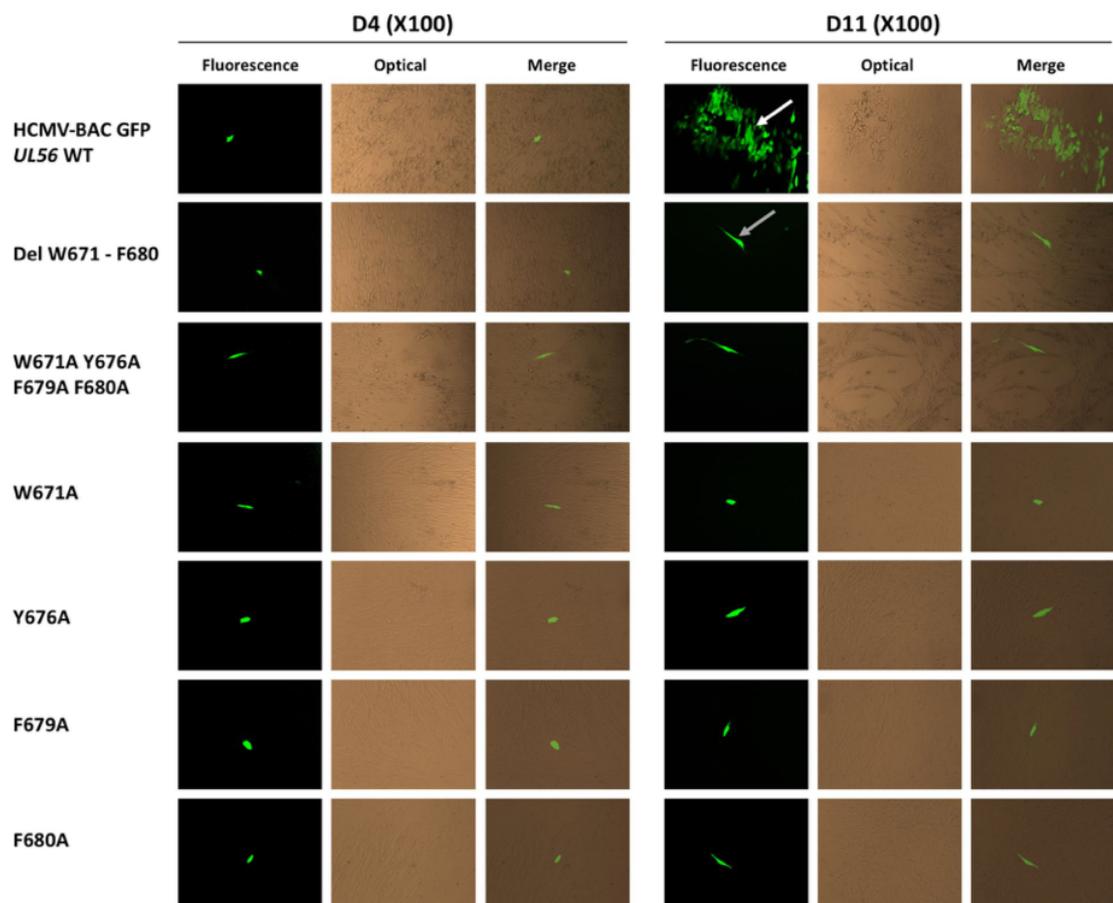


Figure 2. Plaque formation assay in MRC-5 cells after transfection of HCMV-BAC GFP *UL56* WT (AD169) or recombinant virus strains with a deletion, a combination of mutations or a single mutation. Green fluorescent foci (white arrow) were observed with the wild-type HCMV-BAC GFP *UL56* and single infected cells (grey arrow) were observed with the other recombinant viruses. Eleven days after transfection of human fibroblasts, we observed no cytopathic effect for either the mutant with a deletion of $_{671}\text{WMVVVKYMGFF}_{680}$ sequence, or a combination of mutations or single mutations. These mutations dramatically impaired viral replication and propagation in cell-culture.

perfectly or for the less highly conserved (i.e. replaced by another aromatic amino acid) among all the 20 herpesviruses homologues of pUL56 (Fig. 1). To check if these deletion or mutations may disrupt another step of the viral 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 (IEA) and late (gB) viral genes were detected indicating that mutations have no impact on viral gene expression (Fig. 3). Therefore W671, Y676, F679 and F680 within pUL56(671-580) are critical amino acids for viral replication.

pUL56(671-680) is necessary for pUL89 association. HEK293 were transfected with SC784 and pCI-neo His-89 expression plasmids and protein-protein interactions were carried out by the Alpha assay. This technology represents a powerful method to highlight protein-protein interactions^{20,21}. Since we have no virion production for mutant viruses, we chose to study *in vitro* biochemical interactions after protein overexpression in HEK cells which allow introduction of tags (HA and His) for the Alpha assay.

Alpha assay needs both acceptor and donor beads. For this study, HA-coated Donor beads and His-coated Acceptor were used. A singlet of oxygen diffuses from Donor bead to the Acceptor bead, resulting in light production at 615 nm. In the absence of a specific biological interaction between proteins, singlet molecules produced by the Donor bead cannot be detected beyond 200 nm from the Acceptor bead (Fig. 4). First step consisted in verifying the interaction between pUL56-WT and pUL89-WT as a valuable positive control. Alpha assays with 3xHA-pUL56 and 6xHis-pUL89 results in the production of over 9,000 relative light units (RLU), over two-fold more than negative controls (3xHA-pUL56 or 6x His-pUL89) (Fig. 5). pUL56 depleted of its W671-F680 fragment was in turn soaked with pUL89-WT and their affinity assessed by Alpha analysis. The lack

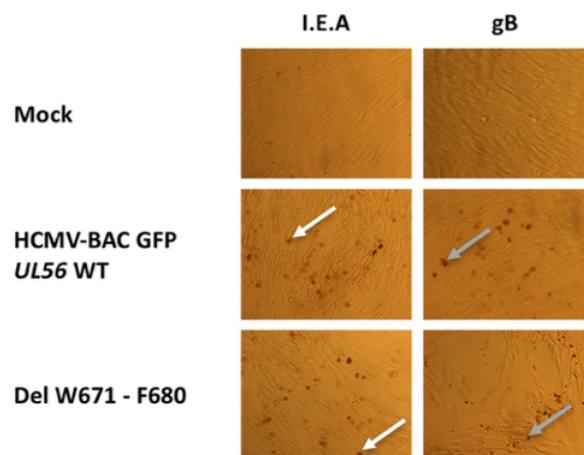


Figure 3. Fragment $_{671}\text{WMVVKYMGFF}_{680}$ of pUL56 is not required for viral gene expression. MRC-5 were transfected with HCMV-BAC WT or the mutant with a deletion of $_{671}\text{WMVVKYMGFF}_{680}$ sequence. Five days after transfection, immunostaining was performed for immediate early (I.E.A) (white arrow) and late (gB) (grey arrow) viral proteins.

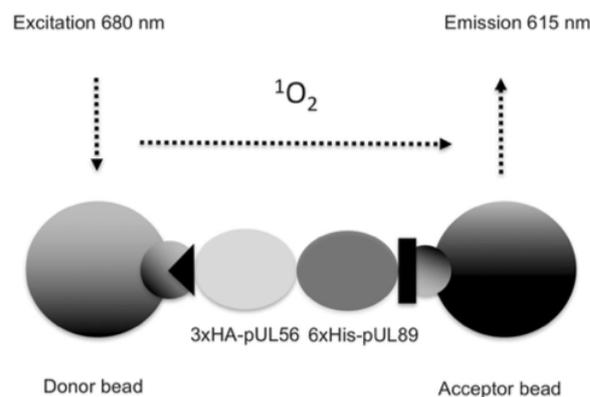


Figure 4. Scheme of an Alpha protein-protein interaction assay, using HA-coated Donor beads, His-coated Acceptor beads, 3xHA-pUL56, 6x His-pUL89. In an Alpha interaction assay, one protein is captured on the Donor beads, and the other protein is captured on the Acceptor beads. In case of interaction, the Donor bead is brought into proximity of the Acceptor bead, and excitation of the Donor bead will result in signal generation dependent on the presence of an interaction.

of pUL56(671-680) decreased the interaction signal by 50% which is significant in this assay. These data strongly suggest that $_{671}\text{WMVVKYMGFF}_{680}$ is necessary for interaction with pUL89.

Discussion

Protein-protein interactions are essential for several biological pathways such as herpesviruses DNA-packaging. Terminase subunits are proteins forming a hetero-oligomeric complex involved in this process. The HCMV terminase complex is composed of the large subunit pUL56 and the small subunit pUL89. Four additional HCMV proteins, namely, pUL51, pUL52, pUL77, pUL93 contribute also to this process⁶⁻¹⁰. To date, the structural knowledge of herpesviruses terminases is poorly understood including interactions inside its molecular assembly. Previous studies suggest that the large subunit pUL56 has an essential role in this process and contains several functional patterns as a zinc finger domain and a C-terminal nuclear localization signal (NLS)^{22,23}. Although pUL56-Cter is sufficient to interact with pUL89(580-600) subunit¹³, precise moieties of pUL56 constituting the interface against pUL89 are still unknown^{12,13}.

In the present study, we show that deletion of pUL56(671-680) abolishes HCMV replication. We then further checked the impact of this sequence on interaction with pUL89 using Alpha technology. Consistent with our hypothesis, deletion of residues W671 to F680 drastically affects the interaction between pUL56 and pUL89. We propose that the peptide WMVVKYMGFF is crucial for the interaction with pUL89 and thereby for

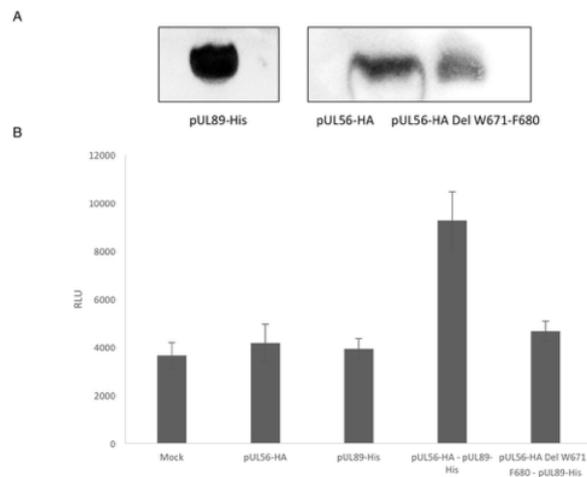


Figure 5. Determination of pUL56 binding domains for the interaction with pUL89. **(A)** Analysis of protein production for alpha assay. Immunoblot was performed using the anti-His antibody for pUL89-His or the anti-HA antibody for pUL56 and pUL56-HA Del W671-F680 and secondary rabbit anti-mouse HRP conjugated antibody. **(B)** Alpha assay results. The Alpha assay for the binding of full-length pUL89 (His-pUL89, $1.5E+03$ nM) was performed with $5E+02$ nM wild-type pUL56 (HA-pUL56) or a deletion mutant of pUL56 (HA-pUL56 Del W671-F680). As a negative control, proteins were used alone and a reaction was performed without proteins (mock). Two measures for each reaction were performed in duplicate.

DNA-packaging. Interestingly, this motif is close to the pUL56 region carrying the ATP-binding site (amino acids 709 to 723)¹¹. It has been previously demonstrated that the ATPase activity responsible for HCMV DNA translocation into capsids is only associated with pUL56 and is enhanced by up to 30% when pUL56 is associated with pUL89¹². In this study, we show a close proximity in the pUL56 sequence between interaction site with pUL89 and the ATP-binding site. Moreover, it is important to highlight that interaction locus W671 to F680 is near to the point mutation A662V selected under totemoglovir (Bay38-4766), a non-nucleoside inhibitor of HCMV²⁴.

The terminase complex is highly CMV-specific, as no counterpart in mammalian cells exists, and thus represents a promising therapeutic strategy for new antivirals development. This has been confirmed by the recent development of the terminase inhibitor letermovir in the transplant setting³. However, its precise site of action in the terminase complex is not yet understood. Clues are offered by a large number of letermovir resistance mutations in *UL56* that have been identified, clustered at *UL56* codons 231–369^{25, 26}, and the uncommon selection of *UL89* D344E under letermovir, which combines with *UL56* mutations to increase the overall level of drug resistance. This hints at the possibility of regions of pUL56 and pUL89 that are close to a small molecule drug binding site. Other terminase inhibitors preferentially select for *UL89* mutations, such as D344E for benzimidazole compounds, along with *UL56* mutations at loci such as codons 204 and 662, suggesting yet other possibilities for subunit interactions. A better understanding of all these potential interactions between terminase subunits of HCMV could be valuable when studying the mechanism of action of drugs and the design of new antivirals such as peptidomimetics²⁷, antibodies or small molecules that target the interaction domain between these essential viral proteins. Indeed, alteration of protein-protein interaction could be used as a way of inhibition of HCMV replication. A modified peptide based on the WMVVKYMGGFF scaffold could serve as molecular target-decoy by interacting with pUL89 and so disrupt the interaction between pUL56 and pUL89. Moreover, we could consider combinations tests of peptides or antibodies with currently available anti-HCMV drugs.

In conclusion, the data from the present study demonstrated that the pUL56 sequence₆₇₁WMVVKYMGGFF₆₈₀ is necessary for its interaction with pUL89 and could constitute a good target to suppress this interaction and thus block HCMV replication.

Materials and Methods

Identification of conserved patterns and secondary structure prediction. The pUL56 amino acid sequence of reference strain AD169²⁸ was aligned with the sequences of 21 homologous proteins from other herpesviruses, as described in Supplementary Table 1. Alignments were performed with Clustal Omega (Ω) multiple sequence alignment (MSA) tool provided by the EMBL-EBI bioinformatics web and programmatic tools framework^{29–31}. Secondary structure prediction was carried by Phyre² web portal³².

Cells and bacterial strains. Human fibroblasts MRC-5 (Biomerieux, France) were cultivated at 37 °C in 5% CO₂ and grown in minimal essential medium (MEM) containing 10% fetal bovine serum with antibiotics. HEK293 (ATCC[®] CRL-1573[™]) were cultivated at 37 °C in 5% CO₂ and grown in minimal essential medium (MEM) containing 10% fetal bovine serum with antibiotics. *E. coli* strain DH5 α and Stellar[™] (Clontech, USA) were used for cloning procedures. *E. coli* strain GS1783 was used for BAC mutagenesis³³.

BAC mutagenesis and reconstitution of mutant viruses. Conserved domains were deleted by “en passant” mutagenesis, a two-step markerless Red recombination system for BAC mutagenesis in *E. coli* strain GS1783. *UL56* point mutations were introduced into an EGFP-expressing HCMV-BAC³³ to generate several mutants (primers used for mutagenesis are described in Supplementary Table 2). Presence of mutations in *UL56* gene of each virus was confirmed by sequencing prior to transfection. The HCMV-BAC contains an enhanced green fluorescent protein (EGFP) gene in the unique short region and was derived from parental strain pHB5, a BAC-cloned genome of the CMV laboratory strain AD169³³. The impact of different mutations on viral growth was assessed using transfection of mutated HCMV-BAC into human fibroblasts MRC-5 using liposomal reagent Transfast™ (Promega, USA) following manufacturer’s instructions³⁴.

Library construction and whole-genome DNA sequencing. After HCMV-BAC preparation, amplicons were purified using magnetic beads (Agencourt AMPure XP) and fragmented using the Ion Xpress Plus DNA Fragment Library Preparation kit (Life Technologies). Barcodes adapters were ligated to fragment ends and 250 bp fragments were collected. The library was PCR amplified, then sequenced on the Ion Proton with the Ion Sequencing kit (Life Technologies). Bases callings were performed with Torrent Suite Software version 5.0.2. Mutations were obtained using Torrent Variant Caller using Somatic variant frequency and AD169_ATCC as reference. Mutations were then filtered against reference (Wild-type HCMV-BAC) using vcftools version 0.1.13.

Viral immediate early and late protein expression. A transfection of mutated HCMV-BAC into human fibroblasts MRC-5 using liposomal reagent Transfast™ (Promega, USA) 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, United Kingdom) proteins in transfected cells.

Plasmids construction for Alpha analysis. For protein production, the SC784 expression plasmid encoding full-length amino-terminal 3xHA-tagged pUL56 and driven by an upstream HCMV major immediate early promoter was cloned in vector pGEM3z. In-Fusion® (Clontech, USA) kit was used following manufacturer’s instructions to clone several *UL56* mutants from source HCMV-BAC in SC784 plasmid. ORF encoding pUL89 is composed of two exons separated by an intron. Both exons were generated by assembling PCR from AD169 strain and cloned into pCI-neo (Promega, USA) with His tag to obtain pCI-neo His-pUL89. Transformations were performed in DH5α cells. The nucleotide sequence of all constructs generated was verified by Sanger sequencing prior to use.

Transfection and proteins purification. HEK293 were transfected with the appropriate expression vectors using liposomal reagent Transfast™ following manufacturer’s instructions, washed and lysed 48 h later with CellLytic M (Sigma-Aldrich, USA). Lysates were cleared by centrifugation.

For purification of HA-tagged pUL56, the cell-free reaction was performed with Anti-HA Immunoprecipitation Kit according to the manufacturer’s protocol (Sigma-Aldrich, USA).

For purification of His-tagged pUL89, the cell-free reaction was performed with Ni resin (Clontech, USA).

All proteins were concentrated approximately 5-fold using Pall centrifugal filters (Pall, USA), and protein concentration was determined by the Bradford method using bovine serum albumin (Sigma-Aldrich, USA) as standard protein.

Western blotting. SDS-PAGE was performed under reducing conditions on Mini-PROTEAN TGX Stain-Free gels (BioRad, USA). Proteins were then transferred onto a Trans-Blot Turbo PVDF Western blotting membrane (BioRad, USA). Antibody dilutions were 1:1,000 for the mouse anti-HA antibody (catalogue number: 2367, Cell Signaling, USA), mouse anti-His antibody (catalogue number: 2366, Cell Signaling, USA) and secondary anti-mouse horseradish peroxidase (HRP)-linked antibody (catalogue number: 7076, Cell Signaling, USA). Signals were visualized using the Substrat HRP Immobilon Western (Merck Millipore, USA) and a ChemiDoc imager (BioRad, USA).

Protein/Protein interaction analysis by Alpha. Alpha (Amplified Luminescent Proximity Homogeneous Assay) experiments were conducted according to the manufacturer’s protocol (PerkinElmer, USA). Five μL of transfected MRC-5 lysate with HCMV-BAC is first disposed in wells of a 96-well AlphaPlate. The final concentration of each proteins was optimized to obtain the best value of interaction. Ten μL of each purified protein were combined (to give a final assay concentration of 500 nM of 3xHA-pUL56 and 1,5 μM of 6xHis-pUL89). Ten μL and 15 μL of 10 mg/mL of donor beads and acceptor beads, respectively, were added and incubated for 1 hour. Plates were read on a PerkinElmer EnVision™ plate reader using an excitation wavelength of 680 nm and emission detection was set at 615 nm.

Data availability. The datasets generated and/or analysed during the current study are available from the corresponding author on reasonable request.

References

1. Alain, S. *et al.* Detection of ganciclovir resistance after valacyclovir-prophylaxis in renal transplant recipients with active cytomegalovirus infection. *J. Med. Virol.* **73**, 566–573 (2004).
2. Hantz, S. *et al.* Drug-resistant cytomegalovirus in transplant recipients: a French cohort study. *J. Antimicrob. Chemother.* **65**, 2628–2640 (2010).
3. Lischka, P. *et al.* *In vitro* and *in vivo* activities of the novel anticytomegalovirus compound AIC246. *Antimicrob. Agents Chemother.* **54**, 1290–1297 (2010).
4. Melendez, D. P. & Razonable, R. R. Letermovir and inhibitors of the terminase complex: a promising new class of investigational antiviral drugs against human cytomegalovirus. *Infect. Drug Resist* **8**, 269–277 (2015).

5. 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.* **82**, 2065–2078 (2008).
6. Borst, E. M. *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.* **87**, 1720–1732 (2013).
7. Borst, E. M. *et al.* The Essential Human Cytomegalovirus Proteins pUL77 and pUL93 are Structural Components Necessary for Viral Genome Encapsidation. *J. Virol.* doi:10.1128/JVI.00384-16 (2016).
8. Köppen-Rung, P., Dittmer, A. & Bogner, E. Intracellular distributions of capsid-associated pUL77 of HCMV and interactions with packaging proteins and pUL93. *J. Virol.* doi:10.1128/JVI.00351-16 (2016).
9. DeRussy, B. M. & Tandon, R. Human cytomegalovirus pUL93 is required for viral genome cleavage and packaging. *J. Virol.* doi:10.1128/JVI.02382-15 (2015).
10. DeRussy, B. M., Boland, M. T. & Tandon, R. Human Cytomegalovirus pUL93 Links Nucleocapsid Maturation and Nuclear Egress. *J. Virol.* doi:10.1128/JVI.00728-16 (2016).
11. 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* **31**, 1426–1433 (2003).
12. Hwang, J.-S. & Bogner, E. ATPase activity of the terminase subunit pUL56 of human cytomegalovirus. *J. Biol. Chem.* **277**, 6943–6948 (2002).
13. Thoma, C. *et al.* Identification of the interaction domain of the small terminase subunit pUL89 with the large subunit pUL56 of human cytomegalovirus. *Biochemistry (Mosc.)* **45**, 8855–8863 (2006).
14. Couvreur, A. *et al.* Insight into the structure of the pUL89 C-terminal domain of the human cytomegalovirus terminase complex. *Proteins* **78**, 1520–1530 (2010).
15. Nadal, M. *et al.* Structure and inhibition of herpesvirus DNA packaging terminase nuclease domain. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **107**, 16078–16083 (2010).
16. Eilers, M., Patel, A. B., Liu, W. & Smith, S. O. Comparison of helix interactions in membrane and soluble alpha-bundle proteins. *Biophys. J.* **82**, 2720–2736 (2002).
17. Ansari, S. & Helms, V. Statistical analysis of predominantly transient protein-protein interfaces. *Proteins* **61**, 344–355 (2005).
18. Scheffczik, H., Savva, C. G. W., Holzenburg, A., Kolesnikova, L. & Bogner, E. The terminase subunits pUL56 and pUL89 of human cytomegalovirus are DNA-metabolizing proteins with toroidal structure. *Nucleic Acids Res* **30**, 1695–1703 (2002).
19. Bradley, A. J. *et al.* High-throughput sequence analysis of variants of human cytomegalovirus strains Towne and AD169. *J. Gen. Virol.* **90**, 2375–2380 (2009).
20. Ullman, E. F. *et al.* Luminescent oxygen channeling immunoassay: measurement of particle binding kinetics by chemiluminescence. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **91**, 5426–5430 (1994).
21. Waller, H., Chatterji, U., Gallay, P., Parkinson, T. & Targett-Adams, P. The use of AlphaLISA technology to detect interaction between hepatitis C virus-encoded NS5A and cyclophilin A. *J. Virol. Methods* **165**, 202–210 (2010).
22. Champier, G. *et al.* Putative functional domains of human cytomegalovirus pUL56 involved in dimerization and benzimidazole D-ribonucleoside activity. *Antivir. Ther.* **13**, 643–654 (2008).
23. 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 alpha. *J. Gen. Virol.* **81**, 2231–2244 (2000).
24. Buerger, I. *et al.* A novel nonnucleoside inhibitor specifically targets cytomegalovirus DNA maturation via the UL89 and UL56 gene products. *J. Virol.* **75**, 9077–9086 (2001).
25. Goldner, T. *et al.* 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 (2011).
26. Chou, S. Rapid *In Vitro* Evolution of Human Cytomegalovirus UL56 Mutations That Confer Letermovir Resistance. *Antimicrob. Agents Chemother.* **59**, 6588–6593 (2015).
27. Walker, M. P., Yao, N. & Hong, Z. Promising candidates for the treatment of chronic hepatitis C. *Expert Opin. Investig. Drugs* **12**, 1269–1280 (2003).
28. Chee, M. S. *et al.* Analysis of the protein-coding content of the sequence of human cytomegalovirus strain AD169. *Curr. Top. Microbiol. Immunol.* **154**, 125–169 (1990).
29. Sievers, F. *et al.* Fast, scalable generation of high-quality protein multiple sequence alignments using Clustal Omega. *Mol. Syst. Biol.* **7**, 539 (2011).
30. McWilliam, H. *et al.* Analysis Tool Web Services from the EMBL-EBI. *Nucleic Acids Res* **41**, W597–600 (2013).
31. Li, W. *et al.* The EMBL-EBI bioinformatics web and programmatic tools framework. *Nucleic Acids Res* **43**, W580–584 (2015).
32. Kelley, L. A., Mezulis, S., Yates, C. M., Wass, M. N. & Sternberg, M. J. E. The Phyre2 web portal for protein modeling, prediction and analysis. *Nat. Protoc.* **10**, 845–858 (2015).
33. 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.* **73**, 8320–8329 (1999).
34. Hantz, S. *et al.* Novel DNA polymerase mutations conferring cytomegalovirus resistance: input of BAC-recombinant phenotyping and 3D model. *Antiviral Res.* **98**, 130–134 (2013).

Acknowledgements

The authors gratefully acknowledge M. Gaschet for her helpful advice for library construction, E. Guérin and V. Tilloy from the technical facilities BISCEM of the Limoges University for their help in NGS analysis. This work was granted by the University of Limoges and the Inserm. G. Ligat received financial support from the National Reference Center for Cytomegaloviruses, the CHU Limoges, and Inserm. S. Chou was supported by U.S. NIH grant A1116635 and Department of Veterans Affairs research funds.

Author Contributions

G. Ligat designed and performed research experiments, statistical analysis, wrote the manuscript and prepared figures. C. Jacquet participated in research experiments. S. Chou designed the plasmid for pUL56 wild-type production. A. Couvreur performed sequences alignment. S. Alain and S. Hantz coordinated the research and manuscript writing. All authors reviewed the manuscript.

Additional Information

Supplementary information accompanies this paper at doi:10.1038/s41598-017-09469-7

Competing Interests: The authors declare that they have no competing interests.

Publisher's note: Springer Nature remains neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.



Open Access This article is licensed under a Creative Commons Attribution 4.0 International License, which permits use, sharing, adaptation, distribution and reproduction in any medium or format, as long as you give appropriate credit to the original author(s) and the source, provide a link to the Creative Commons license, and indicate if changes were made. The images or other third party material in this article are included in the article's Creative Commons license, unless indicated otherwise in a credit line to the material. If material is not included in the article's Creative Commons license and your intended use is not permitted by statutory regulation or exceeds the permitted use, you will need to obtain permission directly from the copyright holder. To view a copy of this license, visit <http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>.

© The Author(s) 2017

ETUDE DU COMPLEXE HELICASE-PRIMASE

Mise en évidence de motifs essentiels à la réplication virale au sein de l'hélicase et de la primase du CMVH

De récentes études ont conduit à l'apparition de nouvelles classes thérapeutiques qui sont actuellement en développement clinique. Des inhibiteurs du complexe hélicase-primase ont ainsi été développés et sont actifs contre l'herpès simplex de type 1 et 2 (HSV-1 et HSV-2) (Pritelivir ou ASP316, un thiazolylamide) **(Wald et al., 2014)**, ou contre HSV-1, HSV-2 et le virus varicelle-zona (Amenamevir ou ASP2151, un dérivé d'oxadiazolylphényle) **(Chono et al., 2010)**. Bien que ces deux molécules soient actives contre les infections par HSV de type 1 et 2, elles ne montrent aucune activité contre l'infection à CMVH **(Dropulic and Cohen, 2010)**.

Le complexe hélicase-primase est un composant majeur du processus de réplication du CMVH. Ce complexe hétérotrimérique est composé de l'hélicase (pUL105), de la primase (pUL70) et du facteur associé à la primase (pUL102). Il fonctionne de concert avec l'ADN polymérase (pUL54) pendant la réplication de l'ADN. Néanmoins, à ce jour, les contributions de chaque sous-unité aux activités biochimiques du complexe demeurent incertaines. Des études antérieures ont révélé des régions conservées et des motifs fonctionnels putatifs au sein de ces protéines **(Woon et al., 2008)**. Concernant l'hélicase, la région N-terminale (G-X₄-GK-TS), une partie du motif ATPase A **(Walker et al., 1982)**, est présente dans de nombreuses protéines de liaison nucléotidique et, selon la cristallographie aux rayons X, forme une boucle de liaison au phosphate **(Saraste et al., 1990) (Story and Steitz, 1992)**. Dans la deuxième région, la cristallographie aux rayons X a montré que le premier D se trouve à proximité immédiate du motif ATPase A et lie le Mg²⁺ à travers une molécule d'eau **(Pai et al., 1990) (Story and Steitz, 1992)**. Par ailleurs, la primase pUL70 présente un motif putatif de liaison à l'ADN **(Woon et al., 2008)**. Cependant, les connaissances structurales des composants du complexe hélicase-primase du CMVH reste, à ce jour, peu nombreuses.

Ainsi, des alignements de pUL105 avec 20 homologues d'herpès virus et la construction d'un modèle théorique tridimensionnelle de pUL105(2-306) ont permis de mettre en évidence les résidus probablement impliqués dans le site de liaison de l'ATP (H82, G120, G123, K126, T127, D261, E262 et Q306). Le modèle théorique de pUL105(2-306) est basé sur la structure

de l'hélicase humaine Upf1 (PDB : 2GJK) (Cheng et al., 2007). Nous avons également utilisé une approche mutationnelle en jouant sur la longueur de la chaîne latérale ou la nature du groupement fonctionnel de chaque résidu identifié afin d'étudier ce site de liaison à l'ATP. Par ailleurs, l'alignement des séquences d'homologues de pUL70 de 20 herpès virus a permis d'identifier trois cystéines (C881, C915 et C920) et une histidine (H886) qui sont fortement conservées chez les herpès virus et qui pourraient être directement impliquées dans la liaison du zinc. La production de virus recombinants et la transfection en fibroblastes humains (MRC-5) nous a permis de valider le poids des différents résidus, potentiellement impliqués dans la fixation de l'ATP (pUL105) et dans la coordination du zinc (pUL70), dans la réplication virale.

Ainsi, nous proposons que la poche catalytique soit composée du motif « Walker A » conservé avec la glycine 120 et 123, la lysine 126 et la thréonine 127 et du motif « Walker B » avec l'aspartate 261 et le glutamate 262. On trouve également la glutamine catalytique 306 et l'histidine 82. La queue polyphosphate de l'ATP se trouve ainsi dans une poche, comportant plusieurs résidus, stabilisée par la présence d'ions Mg^{2+} et de deux molécules d'eau. Par ailleurs, selon notre hypothèse, les acides aminés C881, H886, C915 et C920 font partie d'un motif de liaison à l'ADN riche en cystéine, C881-X₄-H886-X₂₈-C915-X₄-C920 (CHCC).

Le caractère essentiel des résidus participant au motif de fixation de l'ATP de la sous-unité hélicase pUL105 et au motif doigt de zinc de la sous-unité primase pUL70 font de ces domaines de potentielles cibles antivirales pour le développement de nouvelles molécules anti-CMVH. Par ailleurs, l'absence d'activité du pritelevir et de l'amenamévir contre le CMVH suggère des différences structurales. Ainsi, une meilleure compréhension de la relation structure-fonction des sous-unités du complexe hélicase-primase pourrait permettre de mieux appréhender le mécanisme d'action de ces molécules et de développer des dérivés ayant une activité contre le CMVH.

Ces résultats ont fait l'objet d'un quatrième article :

**Identification of essential residues in the HCMV
helicase-primase complex for replication**

Ligat, G., Da Re, S., Alain, S., Hantz, S.

En préparation pour soumission à « *Nature Communications* »

(Les données complémentaires de l'article sont données en annexes)

Identification of essential residues in the HCMV helicase-primase complex for viral replication

Ligat, G.^{1,2}, Da Re, S.¹, Alain, S.^{1,2}, Hantz, S.^{1,2*}

¹Université Limoges, INSERM, CHU Limoges, UMR 1092, Limoges, France

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

Corresponding authors:

Sébastien Hantz UMR 1092, CBRS, Hopital Dupuytren, 2 avenue ML King, 87000 Limoges.
sebastien.hantz@unilim.fr

ABSTRACT

New and promising classes of inhibitors of herpes simplex infections targeting the helicase-primase complex have been reported to block viral replication. Although these molecules are active against herpes simplex or varicella-zoster virus, they showed no activity against the human herpesvirus cytomegalovirus (HCMV). The HCMV helicase-primase complex (pUL105-pUL102-pUL70) is essential for replication of viral DNA and could be a good antiviral target. The role of the individual subunits of this complex has not been clearly defined. Using sequences alignments of herpesviruses homologues, we could identify conserved amino acids in the putative pUL105 ATP-binding site and in the putative pUL70 zinc finger pattern. We also constructed, by homology modeling, a theoretical structure of the N-terminal domain of the pUL105 helicase, that indicate that the conserved amino acid in this domain could be involve in ATP hydrolysis. Mutation of the conserved amino acids allowed to

identify amino acids, in both pUL105 and pUL70, crucial for viral replication. of putative ATP-binding site of pUL105 and zinc finger pattern of pUL70.

INTRODUCTION

Human cytomegalovirus (HCMV) is a ubiquitous pathogen infecting 50-90% of the worldwide population, responsible for symptomless infection in the general population and for life-threatening infections in immunocompromised individuals (Torres-Madriz and Boucher, 2008). In pregnant women, HCMV can cause serious congenital malformations (Leruez-Ville and Ville, 2017). Current approved HCMV inhibitors (ganciclovir, cidofovir and foscarnet) all target the viral DNA polymerase pUL54. They have a poor oral bioavailability, strong adverse effects and cannot be administrated to pregnant women. Furthermore, prolonged prophylactic treatments are known to select for drug resistance mutations in either the viral polymerase pUL54 or the kinase pUL97, or in both of them (Alain et al., 2004) (Hantz et al., 2010) (Lurain and Chou, 2010) (Andouard et al., 2016). New anti-HCMV molecules targeting other viral proteins than the polymerase pUL54 are thus needed. Several have been developed such as letermovir, which targets the viral terminase pUL56 (Lischka et al., 2010) (Goldner et al., 2011) (Melendez and Razonable, 2015) or maribavir that targets the viral kinase pUL97 (Biron et al., 2002) (Alain et al., 2013). Both are undergoing Phase III clinical trials. Recent research in antiviral drugs targeting other herpes viruses lead to the emergence of new therapeutic classes that are currently in clinical development. Two helicase-primase inhibitors have been developed against two alpha herpesvirus: pritelivir (previously named BAY 57-1293 or AIC316), a thiazolylamide, active against herpes simplex virus 1 and 2 (Wald et al., 2014), and amenamevir or ASP2151, an oxadiazolylphenyl derivative, active against both HSV and varicella-zoster virus (VZV or HHV-3) (Chono et al., 2010). Although both molecules are active against HSV infections, they show no activity against HCMV (Dropulic and Cohen, 2010).

The herpesvirus helicase-primase complex is a critical component of the replication process. In HCMV, this heterotrimeric complex is composed by the helicase (pUL105), the primase (pUL70) and the primase-associated factor (pUL102). The complex works in concert with the DNA polymerase (pUL54) during DNA strand replication, but the contribution of each subunit of the complex remains unclear. A previous study identified conserved regions and putative functional patterns in the proteins forming the complex (Woon et al., 2008). The helicase pUL105 was shown to contain six motifs (I to VI) typical of the superfamily-1 class of

helicase proteins (Fig 1.A), motif I and II been recognized respectively as Walker A (or P-loop) and Walker B motif in helicases proteins (Walker et al., 1982). The walker A motif, present in many nucleotide binding proteins such as helicase, binds ATP and forms a phosphate binding loop (Saraste et al., 1990) (Story and Steitz, 1992). The Walker B motif contains highly conserved residues, and the X-ray crystallography structure of several proteins containing a Walker B motif in complex with ADP or ATP, such as the RecA-ADP complex, showed that the first conserved D residue in this motif (Fig 1.B) is in close proximity to the ATPase A motif and binds a Mg²⁺ ion through a water molecule (Pai et al., 1990) (Story and Steitz, 1992). Recently the crystal structure of the helicase domain of the human Upf1 RNA helicase was solved alone or in the presence of ATP (Cheng et al., 2007). Its catalytic ATPase site has been characterized and amino acids involved in ATP-binding and hydrolysis identified (Cheng et al., 2007). The primase pUL70 subunit of the HCMV helicase-primase complex, was shown to contain several conserved motifs or regions among which a region (residues 881-920) that corresponds to a putative zinc-finger pattern initially described in HSV (Biswas and Weller, 1999).

The observation that the two molecules, amenamevir and pritelevir, currently in clinical trial for their anti-HSV and/or VZV activity, do not display activity against HCMV (Dropulic and Cohen, 2010), suggests potential structural differences between the helicase-primase complex of alpha- and beta-herpesvirus.

To better characterized the structure-function relationship of the HCMV helicase-primase complex, we first performed proteins sequences alignments of 20 herpesviruses homologues of pUL105 and pUL70. We then built a theoretical structure of pUL105 N-terminal fragment based on the helicase domain of the human Upf1 RNA helicase (Cheng et al., 2007). We finally performed mutational approaches to investigate the importance of amino acids potentially involved in ATP-binding (pUL105) or in zinc chelation (pUL70). We identified several amino acids in the helicase-primase crucial for viral replication.

MATERIALS AND METHODS

Sequences alignments and homology modeling

The pUL105 and pUL70 amino acid sequences of reference strain AD169 (Chee et al., 1990) were aligned with the sequences of 20 homologous pUL105 and pUL70 proteins from other herpesviruses described respectively in Tables S1 and S2 (supplementary data). Alignments were performed with Clustal Omega (Ω) multiple sequence alignment (MSA) tool provided by the EMBL-EBI bioinformatics web and programmatic tools framework (Sievers et al., 2011) (McWilliam et al., 2013) (Li et al., 2015). The CPHmodels-3.2 server was used to build the theoretical structure of the N-terminal fragment of pUL105 (2-306) using the human Upf1 helicase domain as template (PDB: 2GJK) (Cheng et al., 2007).

Cells and bacterial strains

Human fibroblasts MRC-5 (Biomerieux, France) were cultivated at 37°C in 5% CO₂ and were grown in minimal essential medium (MEM) containing 10% fetal bovine serum with antibiotics. *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 CMV laboratory strain AD169 (Borst et al., 1999).

BAC mutagenesis

Amino acid substitutions in pUL105 and pUL70 were performed by « *en passant* » mutagenesis, a two-step markerless Red-recombination system for BAC mutagenesis in *E. coli* strain GS1783. *UL105* and *UL70* point mutations were introduced into an EGFP-expressing HCMV-BAC (Borst et al., 1999) to generate several mutants. Primers used for mutagenesis are described in Table S3 (supplementary data). Presence of mutations in *UL105* and *UL70* genes of each virus was confirmed by sequencing prior to transfection. Primers used for sequencing are described in Table S4 (supplementary data). We previously showed that the « *en passant*

» mutagenesis does not introduced other mutations that could have a negative impact on viral replication (Ligat et al., 2017).

Reconstitution of virus mutants

The impact of all mutations on viral growth was assessed using transfection of mutated HCMV-BAC into human fibroblasts MRC-5 (Biomerieux, France) using of liposomal reagent Transfast™ (Promega, USA) following manufacturer's instructions.

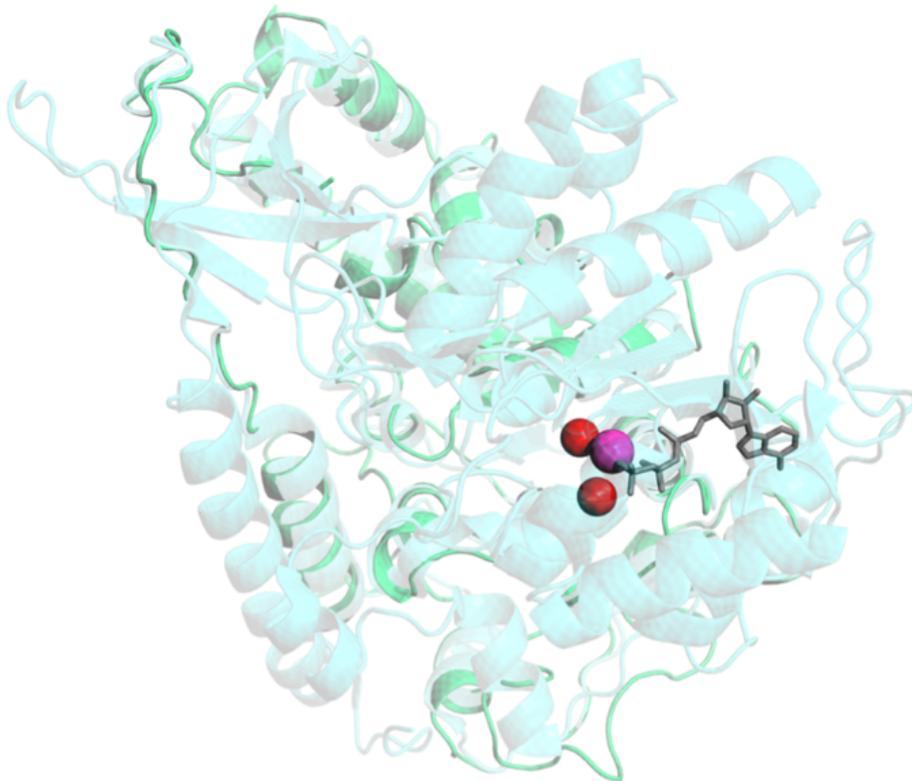
Plaque assays and growth curve analysis

To estimate the impact of each mutation on viral fitness, we inoculated viral recombinant strains and AD169-EGFP in 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. Curves represent the average of three independent experiments. For statistical analysis, the Mann-Whitney test was applied. * $p < 0.05$.

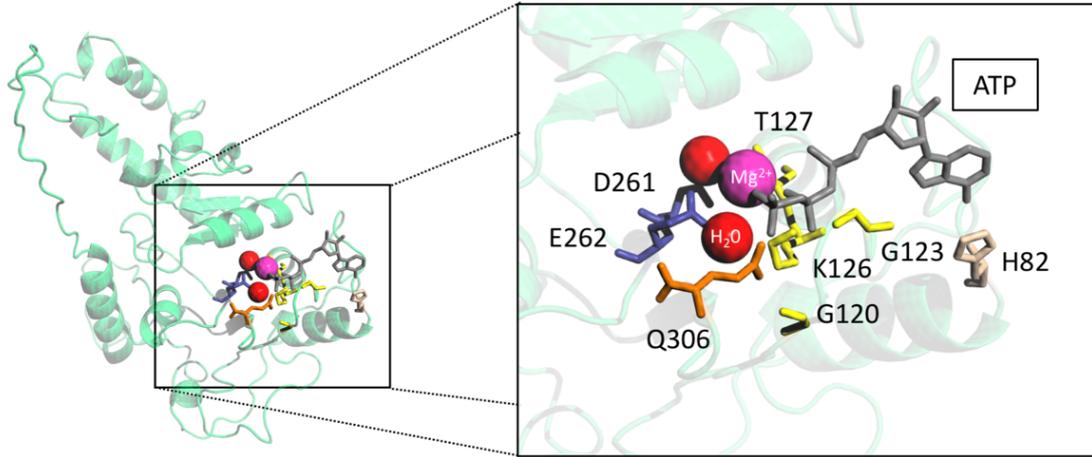
To more precisely define which of these amino acids could be linked to ATP-binding, we tried to build a homology model of pUL105 using the CPHmodels-3.2 server. We could not obtain any homology model when using the whole pUL105 sequence. We thus tested for homologies using only parts of the sequence. We finally succeeded to build a homology model of pUL105 N-terminal domain (residues 2-306 encompassing motif I, II and III). The model was based on the coordinates of the crystal structure of the Upf1 helicase domain bound to the ATP analog, AMPPNP, (Cheng et al., 2007) used as template by the CPHmodels-3.2 server. As shown on Fig. 2.A, the theoretical structure of pUL105(2-306) superposed nicely with the Upf1 helicase domain structure.

Upf1 helicase domain was crystalized with bound AMPPNP in its active domain allowing the identification of amino acids involved in ATP binding, water and Mg^{2+} chelation (Cheng et al., 2007) (Fig. 2.B). Cheng et al. also showed experimentally that in Upf1, amino acids D636, E637 and Q665 are involved in ATPase activity only, while K498, R703 and R865 are involved in both ATP-binding and hydrolysis (Cheng et al., 2007). They suggested that SF1 helicases share a similar ATP-binding and -hydrolysis mechanism irrespective of their DNA or RNA substrates. When inserting ATP, water molecule and Mg^{2+} in the putative active domain of pUL105 theoretical structure and comparing with that of Upf1 helicase domain, it is clear that several of the conserved amino acids identified above, G120, G123, K126, T127, D261, E262 and Q306 could belong to pUL105 helicase ATP-binding site (Fig. 2.B and 2.C). Indeed, G120, G123, K126, T127, D261, E262 and Q306 are structurally equivalent to respectively G492, G495, K498, T499, D636, E337 and Q665 in Upf1. Our structural model of pUL105 thus suggested that K126, D261, E262 and Q306 could be involved in ATP-binding and/or ATP-hydrolysis. Amino acids from Upf1 helicase domain motif IV and VI, respectively R703 and R865, are also involved in ATP-binding and hydrolysis (Fig 3.B) (Cheng et al., 2007). As mentioned above we could not obtain a good theoretical model for the whole helicase pUL105 protein, suggesting that the C-terminal part of HCMV pUL105 and that of human Upf1 may differ.

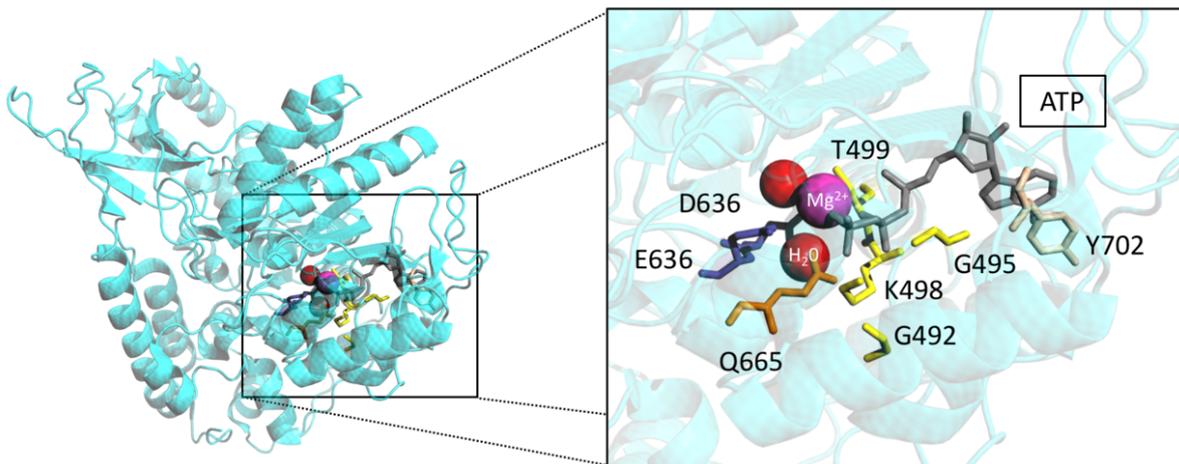
A



B



C



D

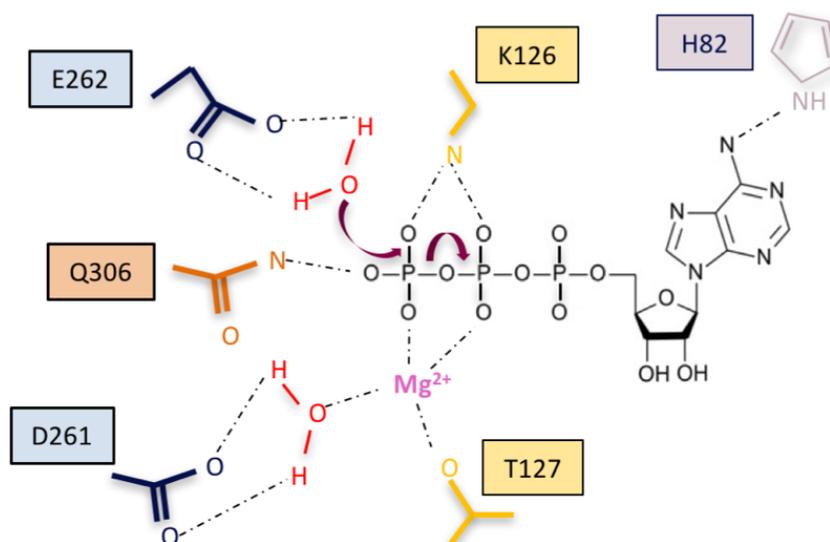


Figure 2: Theoretical structure of pUL105 N-terminal domain. A. Theoretical structure (amino acids 2-306) of pUL105 in green with human Upf1 helicase template in blue with ATP (grey), water molecules (red) and Mg^{2+} ion (magenta). B. Human Upf1 helicase with bound ATP (grey), water molecules (red) and Mg^{2+} ion (magenta). Highlighting of amino acids in Upf1 ATP binding site in close proximity to Mg^{2+} ion, water molecules and ATP. C. N-terminal domain with bound ATP (grey), water molecules (red) and Mg^{2+} ion (magenta). Highlighting of amino acids in pUL105 ATP binding site in close proximity to Mg^{2+} ion, water molecules and ATP. D. Schematic drawing of the putative ATPase reaction and amino acids involved in the helicase pUL105 active site.

Several amino acids of pUL105 putative ATP-binding site are essential for viral replication

To investigate the contribution of the conserved amino acids to viral replication, we produced recombinant EGFP-expressing HCMV-BAC viruses with point mutations in pUL105. Mutations were chosen such as to change the side chain length or the functional group to assess whether the size or the charge is important for function. Therefore, in motif I glycine 120 and 123 were replaced by a serine or a valine (G120S, G120V, G123S and G123V), lysine 126 by an alanine or an asparagine (K126A and K126N), threonine 127 by an alanine (T127A). In motif II, aspartate 261 was mutated in glutamate or asparagine (D261E and D261N) and glutamate E262 in aspartate or a glutamine (E262D and E262Q) and, glutamine 306 in motif III, was mutated by an alanine (Q306A) (Table 1). Although, the residue H82 was not conserved among herpesviruses, the theoretical structure domain of pUL105 (2-306) suggested that this

residue might be involved in ATP-binding (Fig. 2.B and C). Therefore, to test if this amino acid could belong to the catalytic site, histidine 82 was replaced by a lysine or an arginine (H82K and H82R) (Table 1).

HCMV-BAC mutants were transfected in human fibroblasts (MRC-5 cells). Viral replication was monitored over 11 days. No infectious foci could be observed at day 11 post-transfection for all the mutants except for mutants H82K and H82R (Table 1), indicating that mutations of amino acids G120, G123, D261, E262 or Q306 dramatically impaired viral replication and propagation in cell-culture. Unlike the wild-type HCMV-BAC that form large foci at day 11 after transfection, we observed only small foci with H82K and H82R HCMV-BAC mutants (Table 1). To estimate the fitness impact of these two mutants, we compared the growth curves of the wild type and H82K and H82R mutated HCMV-BAC strains. Both mutants grew more slowly than the wild-type (Fig. 3) showing that although the H82 mutations did not impair the formation of foci, they negatively impact HCMV replication capacity and propagation in cell-culture.

Altogether these results demonstrate that residues belonging to the helicase catalytic pocket, G120, G123, D261, E262 and Q306 are crucial for HCMV replication. They comfort the hypothesis that they could be involved in ATP-binding or/and ATP-hydrolysis. As shown on pUL105(2-236) theoretical structural model (Fig. 2.C), the conserved Walker A motif with amino acids G120, G123, L126 and T127 and the Walker B motif with D261 and E262 would form the catalytic domain, by binding the β and γ phosphates of ATP through a coordinated Mg^{2+} and two water molecules to facilitate the nucleophile attack of ATP as found previously in ATPase center (Sun et al., 2007).

Table 1: Overview of HCMV-BAC-*UL105* in putative pUL105 ATP-binding site.

HCMV-BAC	Day 4 post-transfection	Day 11 post-transfection
<i>UL105</i> WT	-	++
H82K	-	+
H82R	-	+
G120S	-	-
G120V	-	-
G123S	-	-
G123V	-	-
K126A	-	-
K126N	-	-
T127A	-	-
D261E	-	-
D261N	-	-
E262D	-	-
E252Q	-	-
Q306A	-	-

-: absence of viral growth; +: small foci; ++: foci

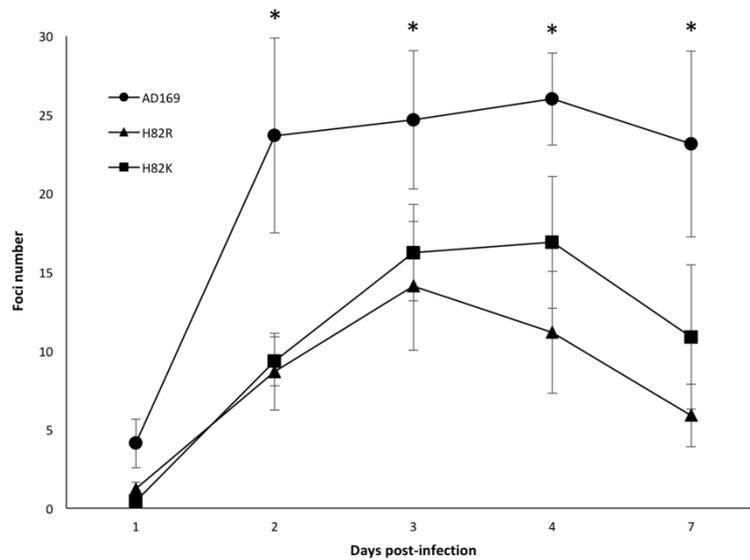


Figure 3: Effect of the helicase pUL105 H82 mutations on viral growth. Growth curves of the virus parental strain HCMV-BAC AD169 and its recombinant strains HCMV-BAC UL105H82K and H82R. Fluorescent foci were counted daily from day 1 to day 7. Curves are the average of three independent experiments. *, $p < 0.05$ (Mann-Whitney test).

The putative zinc finger pattern of pUL70 is required for viral replication

The primase subunit pUL70 of the helicase-primase complex, display a putative DNA binding pattern with a putative zing finger motif (Woon et al., 2008).

We aligned the sequences of HCMV pUL70 homologues from the 20 herpesviruses used above (Table S2). We identified within the putative metal-binding pattern of pUL70 three cysteines (C881, C915 and C920) and one histidine (H886) that are highly conserved among herpesviruses (Fig. 4.A) and could be directly involved in zinc ion binding (Fig. 4.B).

A

	880	890	900	910	920
ALPHAHERPES					
HHV_1	LQQLSCLRFKH	GRASRATARTF	VALSVGANNRL	CVSLCQQCF	FAAKCDSNR
HHV_2	LNQSLSCLRFKH	GRASRATARTF	LALSVGTNNRL	CASLCQQCF	FATKCDNNR
CeHV_1	FQHGLSCLRFKH	GRNSRATARTF	LALSVGARNGLC	VSLCQQCF	FASKCDSNR
CeHV_2	PQHGLSCLRFKH	GRGSRATARTF	LALSVGARNGLC	VSLCQQCF	FASKCDSNR
EHV_1	RSQGFSLRAKHL	RSARGLARTFL	SISADVHGRLC	ASISQQCF	FATKCGNNK
MEHV_1	RGRGFTCMRYKH	TRSSRTSARSY	LALNVDAGHRLC	VCVIQQCF	FATKCGNNK
HHV_3	GTKGFTCLRYPH	RGGRTPARTFV	SLRVDHNNRLC	ISLAQQCF	FATKCDNSR
SUID	-PARFSCLRARH	ARSP--PARTF	VALSVDAHDRLC	ISLSQQCF	FATKCGSNA
GaHV_1	GRATFTCLKHS	RSAAAQTVITS	VAVAINSQQGN	PYAAFQTKC	FATKCGGNT
GaHV_2	YRHGFTCVRFKH	ARARRASARSY	LALNVDAGHRLC	VCVIQQCF	FAAKCGNNK
GaHV_3	RAHGFTCVRFKH	TRTRMSSRSY	LSLNI DAHGRLC	CACVIQQCF	FAAKCGNNK
BETAHERPES					
AD169	RTRDFRCLNYT	HR-NPQETVQV	FIDLRTTEHSY	LWASLWSR	CFTKKCHSNA
RhCMV	RTKDFRCLNYT	HR-NPQETVQV	FIDLRTTEHSY	LWASLWSR	CFTKKCHSNA
MCMV	RARDFSLARE	HHY-TRQETVQV	FLDIRGQRRNV	WATLWSR	CFANKCQSNA
RCMV	RGRDFRCLTTE	HHFRWRET	VNVFLDLRADR	GGNVWATLWSR	CFTKKCHSNA
GAMMAHERPES					
HHV_8	QGRHFCLINHN	HK-NKSKTVR	VFLTLHSIRV	SEVTVTLM	SCCFASKCNNNV
HHV_4_1	RGRNFACL	RHTHR-ASPKN	VRFVLVLYY	-TSQAITVT	FMSCCFAGRCGANQ
HHV_4_2	RGRNFACL	RHTHR-ASSKN	VRFVLVLYY	-TSQAITVT	FMSCCFAGRCGANQ

B

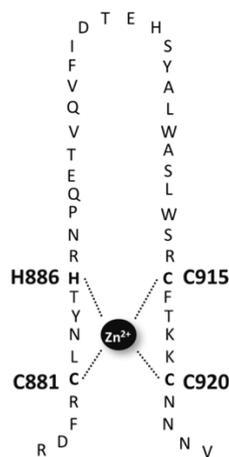


Figure 4: Conserved zinc finger region and amino acids in primase pUL70. A. Sequences alignment of the zinc finger conserved region of pUL70 from 21 herpesviruses. Sequence numbering is consistent with that of the HCMV reference strain AD169 residues. Key residues involved in the formation of the zinc-finger motif are shown as white letters on a black background. B. Representation of the putative zinc finger motif: C881-X₂-H886-X₂₈-C915-X₄-C920 (CHCC). Amino acids implicated in zinc ion binding are numbered.

To investigate the role of these residues in viral replication, we produced the recombinant EGFP-expressing HCMV-BAC viruses C881S, H886A, C915S, C920S and tested their ability to replicate in human fibroblasts MRC-5 cells. Unlike the wild-type HCMV-BAC, none of the mutants did form foci eleven days after transfection (Table 2), indicating that these mutations dramatically impaired viral replication and propagation in cell-culture.

These results indicate that amino acids C881, H886, C915 and C920 are part of the cysteine-rich metal-binding motif in the C-terminal HCMV pUL70. In this protein, the zing finger motif would be: C881-X₄-H886-X₂₈-C915-X₄-C920 (CHCC). They may be required for both pUL70 proper folding and its function as DNA binding.

Table 2: Overview of HCMV-BAC-UL70 mutants in putative pUL70 zinc-finger pattern.

HCMV-BAC	Day 4 post-transfection	Day 11 post-transfection
<i>UL70</i> WT	-	++
C881S	-	-
H886A	-	-
C915S	-	-
C920S	-	-

-: absence of viral growth; +: small foci; ++: foci

CONCLUDING REMARKS

To date the only drugs licensed for the treatment of HCMV infections are ganciclovir, cidofovir and foscarnet, all targeting the viral polymerase. Limitations of these antivirals are on the one hand, their significant dose-limiting toxicity, and on the other hand the selection of viral resistance with potential cross-resistance to currently available therapies when used in prolonged therapy or at low dosage. New anti-HCMV molecules targeting others viral proteins are thus needed to replace or to use in combination with current polymerase pUL54 inhibitors to decrease the probability to select for resistance. A better understanding of the structure-function relationships of essential viral proteins and their mechanism of action is needed in order to identify and develop new anti-HCMV drugs such as small molecules, peptides or antibodies

ACKNOWLEDGEMENTS

This work was granted by Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche, Conseil Régional du Limousin and Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale (Inserm). G. Ligat received financial support from the National Reference Center for Cytomegaloviruses, the CHU Limoges, and Inserm. The funders had no role in study design, data collection and interpretation, or the decision to submit the work for publication. The authors acknowledge E. Guérin and V. Tilloy from the technical facilities BISCEm, and B. Chantemargue (UMR 850) for his help in the figures.

REFERENCES

Alain, S., Hantz, S., Scieux, C., Karras, A., Mazon, M.C., Szlag, J.C., Imbert, B.M., Fillet, A.M., Gouarin, S., Mengelle, C., et al. (2004). Detection of ganciclovir resistance after valacyclovir prophylaxis in renal transplant recipients with active cytomegalovirus infection. *J. Med. Virol.* 73, 566–573.

Alain, S., Revest, M., Veyer, D., Essig, M., Rerolles, J.P., Rawlinson, W., Mengelle, C., Huynh, A., Kamar, N., Garrigue, I., et al. (2013). Maribavir use in practice for cytomegalovirus infection in French transplantation centers. *Transplant. Proc.* 45, 1603–1607.

Andouard, D., Mazon, M.-C., Ligat, G., Couvreur, A., Pouteil-Noble, C., Cahen, R., Yasdanpanah, Y., Deering, M., Viget, N., Alain, S., et al. (2016). Contrasting effect of new HCMV pUL54 mutations on antiviral drug susceptibility: Benefits and limits of 3D analysis. *Antiviral Res.* 129, 115–119.

Biron, K.K., Harvey, R.J., Chamberlain, S.C., Good, S.S., Smith, A.A., Davis, M.G., Talarico, C.L., Miller, W.H., Ferris, R., Dornsife, R.E., et al. (2002). Potent and selective inhibition of human cytomegalovirus replication by 1263W94, a benzimidazole L-riboside with a unique mode of action. *Antimicrob. Agents Chemother.* 46, 2365–2372.

Biswas, N., and Weller, S.K. (1999). A mutation in the C-terminal putative Zn²⁺ finger motif of UL52 severely affects the biochemical activities of the HSV-1 helicase-primase subcomplex. *J. Biol. Chem.* 274, 8068–8076.

Borst, E.M., Hahn, G., Koszinowski, U.H., and Messerle, M. (1999). Cloning of the human cytomegalovirus (HCMV) genome as an infectious bacterial artificial chromosome in *Escherichia coli*: a new approach for construction of HCMV mutants. *J. Virol.* 73, 8320–8329.

Chee, M.S., Bankier, A.T., Beck, S., Bohni, R., Brown, C.M., Cerny, R., Horsnell, T., Hutchison, C.A., Kouzarides, T., and 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.

Cheng, Z., Muhlrad, D., Lim, M.K., Parker, R., and Song, H. (2007). Structural and functional insights into the human Upf1 helicase core. *EMBO J.* 26, 253–264.

- Chono, K., Katsumata, K., Kontani, T., Kobayashi, M., Sudo, K., Yokota, T., Konno, K., Shimizu, Y., and Suzuki, H. (2010). ASP2151, a novel helicase-primase inhibitor, possesses antiviral activity against varicella-zoster virus and herpes simplex virus types 1 and 2. *J. Antimicrob. Chemother.* 65, 1733–1741.
- Dropulic, L.K., and Cohen, J.I. (2010). Update on new antivirals under development for the treatment of double-stranded DNA virus infections. *Clin. Pharmacol. Ther.* 88, 610–619.
- Goldner, T., Hewlett, G., Ettischer, N., Ruebsamen-Schaeff, H., Zimmermann, H., and 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.
- Hantz, S., Garnier-Geoffroy, F., Mazon, M.-C., Garrigue, I., Merville, P., Mengelle, C., Rostaing, L., Saint Marcoux, F., Essig, M., Rerolle, J.-P., et al. (2010). Drug-resistant cytomegalovirus in transplant recipients: a French cohort study. *J. Antimicrob. Chemother.* 65, 2628–2640.
- Leruez-Ville, M., and Ville, Y. (2017). Fetal cytomegalovirus infection. *Best Pract. Res. Clin. Obstet. Gynaecol.* 38, 97–107.
- Li, W., Cowley, A., Uludag, M., Gur, T., McWilliam, H., Squizzato, S., Park, Y.M., Buso, N., and Lopez, R. (2015). The EMBL-EBI bioinformatics web and programmatic tools framework. *Nucleic Acids Res.* 43, W580–W584.
- Ligat, G., Jacquet, C., Chou, S., Couvreur, A., Alain, S., and Hantz, S. (2017). Identification of a short sequence in the HCMV terminase pUL56 essential for interaction with pUL89 subunit. *Sci. Rep.* 7, 8796.
- Lischka, P., Hewlett, G., Wunberg, T., Baumeister, J., Paulsen, D., Goldner, T., Ruebsamen-Schaeff, H., and Zimmermann, H. (2010). In vitro and in vivo activities of the novel anticytomegalovirus compound AIC246. *Antimicrob. Agents Chemother.* 54, 1290–1297.
- Lurain, N.S., and Chou, S. (2010). Antiviral drug resistance of human cytomegalovirus. *Clin. Microbiol. Rev.* 23, 689–712.
- McWilliam, H., Li, W., Uludag, M., Squizzato, S., Park, Y.M., Buso, N., Cowley, A.P., and Lopez, R. (2013). Analysis Tool Web Services from the EMBL-EBI. *Nucleic Acids Res.* 41, W597–W600.

- Melendez, D.P., and Razonable, R.R. (2015). Letermovir and inhibitors of the terminase complex: a promising new class of investigational antiviral drugs against human cytomegalovirus. *Infect. Drug Resist.* 8, 269–277.
- Pai, E.F., Krengel, U., Petsko, G.A., Goody, R.S., Kabsch, W., and Wittinghofer, A. (1990). Refined crystal structure of the triphosphate conformation of H-ras p21 at 1.35 Å resolution: implications for the mechanism of GTP hydrolysis. *EMBO J.* 9, 2351–2359.
- Saraste, M., Sibbald, P.R., and Wittinghofer, A. (1990). The P-loop--a common motif in ATP- and GTP-binding proteins. *Trends Biochem. Sci.* 15, 430–434.
- Sievers, F., Wilm, A., Dineen, D., Gibson, T.J., Karplus, K., Li, W., Lopez, R., McWilliam, H., Remmert, M., Söding, J., et al. (2011). Fast, scalable generation of high-quality protein multiple sequence alignments using Clustal Omega. *Mol. Syst. Biol.* 7, 539.
- Story, R.M., and Steitz, T.A. (1992). Structure of the recA protein-ADP complex. *Nature* 355, 374–376.
- Sun, S., Kondabagil, K., Gentz, P.M., Rossmann, M.G., and Rao, V.B. (2007). The structure of the ATPase that powers DNA packaging into bacteriophage T4 procapsids. *Mol. Cell* 25, 943–949.
- Torres-Madriz, G., and Boucher, H.W. (2008). Immunocompromised hosts: perspectives in the treatment and prophylaxis of cytomegalovirus disease in solid-organ transplant recipients. *Clin. Infect. Dis. Off. Publ. Infect. Dis. Soc. Am.* 47, 702–711.
- Wald, A., Corey, L., Timmler, B., Magaret, A., Warren, T., Tyring, S., Johnston, C., Kriesel, J., Fife, K., Galitz, L., et al. (2014). Helicase-primase inhibitor pritelivir for HSV-2 infection. *N. Engl. J. Med.* 370, 201–210.
- Walker, J.E., Saraste, M., Runswick, M.J., and Gay, N.J. (1982). Distantly related sequences in the alpha- and beta-subunits of ATP synthase, myosin, kinases and other ATP-requiring enzymes and a common nucleotide binding fold. *EMBO J.* 1, 945–951.
- Woon, H.-G., Scott, G.M., Yiu, K.L., Miles, D.H., and Rawlinson, W.D. (2008). Identification of putative functional motifs in viral proteins essential for human cytomegalovirus DNA replication. *Virus Genes* 37, 193–202.

DISCUSSION ET PERSPECTIVES

A ce jour, le cytomegalovirus humain (CMVH) reste une cause majeure de morbidité et de mortalité en transplantation et un pathogène opportuniste majeur chez les patients au stade SIDA. Le CMVH est aussi la première cause d'infection congénitale d'origine virale et par conséquent représente un problème de santé publique. Bien qu'efficaces, les antiviraux actuellement utilisés en clinique, tous inhibiteurs de l'ADN polymérase virale pUL54, sont peu nombreux, présentent une toxicité hématologique et/ou rénale, entraînent l'émergence de mutations de résistances et sont contre-indiqués pendant la grossesse. Il est donc essentiel d'une part de poursuivre l'étude des nouvelles mutations détectées chez les patients sous traitement antiviral afin de pouvoir préciser leur rôle dans la résistance et d'autre part de continuer la caractérisation de protéines du CMVH impliquées dans des étapes clés de la réplication virale, ces dernières constituant de futures cibles thérapeutiques.

Caractérisation de nouvelles mutations de résistance

La caractérisation de nouvelles mutations non décrites détectées chez des patients en impasse thérapeutique permet d'envisager une adaptation du traitement. Grâce à une collaboration précédemment établie avec le Professeur MESSERLE (Hanover Medical School, Allemagne), nous avons pu disposer d'un BAC CMVH (Chromosome Bactérien Artificiel) afin de pouvoir construire des virus recombinants par mutagenèse « *en passant* ». Ces vecteurs permettent l'intégration de grands fragments d'ADN et facilitent la manipulation du génome viral. L'introduction de la mutation, par mutagenèse « *en passant* », dans le BAC contenant le génome entier de la souche de référence AD169 nous permet de tester, après transfection en cellules humaines, la sensibilité de la souche aux antiviraux couramment utilisés en clinique et l'impact de la mutation sur la capacité répliquative virale. Enfin, par une approche bio-informatique, la modélisation de pUL54, par homologie avec la polymérase de l'HSV, nous permet de visualiser la localisation des mutations au niveau des domaines fonctionnels de la protéine et de prédire l'impact sur l'activité de la polymérase.

Au cours de ce travail, différentes mutations ont été caractérisées. Les mutations D515Y localisée dans le domaine « *3'-5' exonucléase* » et V787A localisée dans le domaine catalytique VI de la polymérase virale pUL54 induisent une résistance élevée au GCV et FOS. Les courbes de croissance pour les deux souches mutées sont semblables à celles du BAC

CMVH de type sauvage montrant que les mutations *UL54* D515Y et V787A n'ont pas d'impact sur la capacité répliquative du CMVH. En ce qui concerne le locus 515, le Y responsable de la résistance au GCV, est un acide aminé non polaire avec une chaîne latérale « *imposante* » suggérant que le mécanisme de résistance impliqué est lié à la taille. Le carbone alpha du résidu 515 est proche de l'un des ions Mg^{2+} constituant la poche catalytique du domaine « *3'-5' exonucléase* » de pUL54. Par conséquent, l'interaction électrostatique entre l'ion Mg^{2+} et la chaîne latérale du résidu muté peut avoir une incidence sur les distances entre les résidus catalytiques D301 et E303 vers les ions Mg^{2+} . Néanmoins, la résistance au FOS à cette position est moins évidente car le mécanisme d'action du FOS a lieu à l'interface entre les domaines « *fingers* » et « *thumb* » en « *mimant* » la queue polyphosphate du nucléoside (**Zahn et al., 2011**). Ainsi, la résistance aux FOS localisées dans le domaine « *3'-5' exonucléase* » est plus difficile à expliquer. Les substitutions d'un acide aminé aliphatique par un autre aliphatique, déjà caractérisées comme étant sensibles à différents antiviraux, appartiennent généralement aux domaines « *palm* » et « *3'-5' exonucléase* ». Une analyse minutieuse révèle que les mutations impliquant le noyau du domaine « *fingers* » (c'est-à-dire les fragments 781-787 et 809-812) sont l'emplacement de la résistance antivirale. Le noyau de ce domaine renferme des résidus critiques pour l'activité polymérase de pUL54 (R784, R788, K811 et N815). Un changement au centre du « *leucine zipper* » constituant ce domaine, comme la substitution V787A, pourrait altérer l'insertion de l'antiviral. Cependant, la substitution L501I (**Cihlar et al., 1998**) constitue une exception à cette règle et il est difficile d'en donner une explication. Ce travail a fait l'objet d'une première publication « ***Contrasting effect of new HCMV pUL54 mutations on antiviral drug susceptibility: Benefits and limits of 3D analysis*** » parue dans la revue « ***Antiviral Research*** ».

Afin de compléter l'étude de nouvelles mutations détectées chez des patients présentant une résistance clinique au traitement, nous avons caractérisé le profil de 7 mutations non décrites à ce jour. Concernant pUL54, nos premiers résultats semblent montrer que la mutation H686Y conférerait une résistance au CDV. Ces résultats seraient à confirmer avec d'autres essais antiviraux car les valeurs de CI50 varient beaucoup d'une manipulation à l'autre. De plus, les patients chez lesquels nous avons retrouvé cette souche mutée n'ont reçu que du GCV ou du VGCV, parfois sur des durées relativement courtes. Pour l'un d'entre eux, nous avons vu émerger une mutation A594V (pUL97) sur le 3^{ème} prélèvement reçu pour

recherche de résistance alors que la mutation H686Y était présente depuis le premier prélèvement. Par ailleurs, l'analyse sur le modèle construit par homologie avec pUL54 (**Hantz et al., 2013**) montre qu'il s'agit d'une zone non conservée sans structuration. Enfin, de nombreuses mutations de polymorphisme sont décrites dans cette zone (**Lurain and Chou, 2010**). L'ensemble de ces éléments sont donc plutôt en faveur d'une nouvelle mutation de polymorphisme.

La mutation G698V confère quant à elle une résistance au FOS. Etant donné sa localisation dans le domaine II de la polymérase (696-742), elle viendrait ainsi compléter la liste des mutations de ce domaine présentant une résistance au FOS.

Concernant pUL97, la mutation F342Y confère une résistance au GCV. Cela confirme que l'acide aminé 342 est essentiel au fonctionnement de la kinase, puisque la mutation F342S avait déjà été décrite comme responsable de résistance au GCV (**Chou et al., 2013**). Sachant qu'elle a été retrouvée à deux reprises mais dans des situations différentes (chez un transplanté cardiaque en mutation isolée et chez un transplanté rénal en association avec la mutation M460V), il serait intéressant de construire le double mutant M460V+F342Y afin d'évaluer l'action conjuguée de 2 mutations de résistance au GCV. Par ailleurs, l'adjonction d'un groupement -OH au niveau d'un acide aminé du site catalytique peut expliquer l'impact sur la résistance au GCV induite par cette mutation.

Les mutations de la polymérase I726T et P747L font diminuer significativement le nombre de foyers d'infection au cours du temps en comparaison à la souche sauvage, ce qui semble indiquer un rôle important de ces acides aminés dans la fonction de ces deux protéines. En effet, l'isoleucine 726 fait partie d'une hélice alpha et sa mutation par une thréonine peut perturber les interactions au niveau de cette hélice. Par contre notre modèle ne permet pas de prédire l'impact de la mutation P747L.

Enfin, les mutations, N710K, I726T, P747L de la polymérase pUL54 et H393Y de la kinase virale pUL97 participent vraisemblablement au polymorphisme du CMVH.

L'ensemble de ces résultats confirme qu'il est essentiel de poursuivre la surveillance de l'émergence de résistance chez les patients en situation de non-réponse au traitement antiviral afin d'identifier de nouvelles mutations et également de continuer la caractérisation phénotypique de ces nouvelles mutations, l'utilisation d'un modèle prédictif pouvant apporter

des éléments de réponse mais ne pouvant, en l'état, se substituer à l'analyse phénotypique. En l'absence de structure tridimensionnelle de la kinase ou de la polymérase du CMVH, du fait des difficultés rencontrées pour les produire en quantité suffisante, la modélisation permet une approche des interactions entre l'antiviral et sa cible. Dans ce contexte, nous travaillons actuellement sur l'élaboration d'un modèle dynamique en collaboration avec le Dr. Patrick Trouillas (UMR Inserm 850, Université de Limoges) et le Dr. Pavel Banáš (Department of Physical Chemistry, Palacky University Olomouc, Czech Republic) prenant en compte les données structurales ainsi que les données phénotypiques afin de proposer une réponse plus rapide que la caractérisation phénotypique sur l'impact de nouvelles mutations. Enfin, ce modèle permettrait *in fine* de dessiner des antiviraux à meilleure barrière génétique ou avec une efficacité supérieure.

Le complexe terminase comme nouvelle cible

De par la toxicité des molécules couramment utilisées et l'émergence de résistance, le développement de nouvelles molécules ciblant d'autres voies de la réplication virale devient essentiel. Le letermovir, une nouvelle molécule en développement appartenant à la famille des quinazolines, cible une étape exclusivement virale, l'encapsidation en interagissant avec le complexe terminase et plus particulièrement la sous-unité pUL56 (**Goldner et al., 2011**). Néanmoins, son mécanisme d'action n'est toujours pas connu avec précision. Par ailleurs, jusqu'à présent peu d'informations structurales et fonctionnelles sont disponibles concernant ces diverses cibles thérapeutiques.

L'intérêt grandissant pour ce complexe terminase s'explique par la présence de toutes les caractéristiques de la cible virale de choix. En effet, ce complexe hétéro-oligomérique composé notamment des protéines pUL56-pUL89-pUL51 est indispensable à la réplication virale et il n'existe pas d'homologues cellulaires. Par ailleurs, de multiples inhibiteurs pourraient cibler différents niveaux. En effet, ce complexe qui permet l'intégration d'une unité de génome dans une procapside, possède de nombreuses activités. Ainsi, comme discuté dans la revue « ***Human cytomegalovirus terminase complex as an antiviral target, a close up view*** » présentée dans ce manuscrit, la grande sous-unité du complexe terminase est composée de 12 régions conservées (I-XII). Cette protéine hautement conservée d'environ 130 kDa présente

une capacité à former des dimères (**Savva et al., 2004**). pUL56 est notamment impliquée dans l'activité ATPase du complexe et la reconnaissance de motifs cis-régulateurs « *pac* » nécessaire au clivage des concatémères d'ADN, produit de la réplication virale (**Hwang and Bogner, 2002**). Néanmoins, bien que pUL56 présente de nombreux sites fonctionnels, à ce jour, aucune structure cristalline n'a été obtenue et son association avec les autres protéines du complexe n'a pas été élucidée.

L'absence de données structurales limite le développement de nouveaux antiviraux. En effet, à ce jour, seule la structure du domaine C-terminal de la protéine pUL89 du complexe a pu être résolue par cristallographie (**Nadal et al., 2010**). 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 existent sur celle-ci. Ainsi, au laboratoire, des travaux ont été menés dans ce sens afin de compléter les informations obtenues sur la protéine pUL56. Des tentatives de production de cette protéine ont été initiées. Cependant aucune production de masse compatible avec des essais de cristallisation n'a pu être obtenue à ce jour.

L'échec de l'approche structurale pour étudier le complexe terminase du CMVH, et notamment pUL56, nous a poussés à envisager une approche fonctionnelle. Des alignements de séquences et une analyse de la structure secondaire ont permis de prédire plusieurs acides aminés pouvant avoir un rôle essentiel dans le fonctionnement du complexe terminase. Un motif LATLNDIERFL (résidus 134 à 144) caractéristique des LAGLIDADG *Homing Endonuclease* a été mis en évidence. Bien que ce motif représente le motif le plus conservé au sein de ces endonucléases, il reste cependant très variable. Dans le cas des homodimères, rappelant la dimérisation de pUL56 (**Savva et al., 2004**), la structure est formée par deux hélices α portant les deux motifs LAGLIDADG situés en N-terminale de la protéine. Ainsi, le motif LATLNDIERFL de pUL56 pourrait former l'interface de l'interaction, où les résidus hydrophobes leucine et isoleucine participent à la dimérisation, stabilisée par des interactions se trouvant ailleurs. Les résidus acides conservés comme le glutamate ou l'aspartate permettent la chélation d'ions essentiels à l'activité catalytique du dimère. Ainsi, la dimérisation permet le rapprochement des deux résidus acides des deux motifs LAGLIDADG. Cette famille de protéines possède un enchaînement typique de structures secondaires $\alpha\beta\beta\alpha\beta\beta\alpha$ dont certains brins β peuvent être non structurés en absence d'ADN. D'après nos prédictions de structure secondaires, pUL56 possède, au niveau de ce potentiel LATLNDIERFL, un enchaînement de structures $\alpha\beta\beta\alpha\beta\alpha$. Ces

endonucléases présentent également la capacité de se lier à l'ADN de façon site spécifique via des brins β qui forment une structure en forme de selle à cheval comportant des acides aminés basiques et polaires. Comme discuté dans la revue, « ***Human cytomegalovirus terminase complex as an antiviral target, a close up view*** », pUL56 est capable de se lier à l'ADN de manière site spécifique au niveau des séquences « *pac* » (**Hwang and Bogner, 2002**). En N-terminal, une région hautement conservée pourrait former un motif putatif en doigt de zinc de trois façons différentes faisant intervenir des résidus cystéine et histidine C191-X₂-C194-X₂₂-C217-X-H219 (CCCH), C191-X₂-C194-X₂₂-C217-X₅-H223 (CCCH) et C191-X₂-C194-X₂₄-H219-X₃-H223 (CCHH). Ce motif pourrait potentiellement être impliqué dans l'interaction de pUL56 avec l'ADN. De façon intéressante, ce motif appartient à une région de pUL56 région portant la mutation Q204R qui confère une résistance au BDCRB. Le processus d'encapsidation nécessite plusieurs protéines formant le complexe terminase, pUL56 et pUL89 étant les deux principales. Récemment, plusieurs études ont mis en évidence l'implication de quatre protéines supplémentaires, à savoir pUL51, pUL52, pUL77 et pUL93 (**Borst et al., 2008**) (**Borst et al., 2013**) (**Borst et al., 2016**) (**Köppen-Rung et al., 2016**) (**DeRussy and Tandon, 2015**) (**DeRussy et al., 2016**). Ainsi, ce processus est notamment possible par des interactions entre les différents composants du complexe terminase. Bien que l'association entre pUL56 et pUL89 ait été rapportée il y a quelques années, le domaine précis de pUL56 impliquée dans cette interaction est encore inconnu. Néanmoins, des expériences de co-immunoprécipitation ont toutefois mis en évidence une interaction entre la moitié C-terminale de pUL56 et pUL89 (**Hwang and Bogner, 2002**) (**Thoma et al., 2006**). Les alignements de séquences protéiques de pUL56 que nous avons réalisés avec 20 homologues de différents herpès virus ont permis de mettre en évidence le fragment ⁶⁷¹WMVVKYMGGFF₆₈₀ situé dans la partie C-terminale de pUL56. pUL56(671-680) pourrait être nécessaire à l'interaction avec la sous-unité pUL89.

Afin d'étudier l'implication de ces motifs putatifs dans la réplication du CMVH, nous avons envisagé une approche mutationnelle. Ainsi, et afin de confirmer le rôle de ces motifs et leur possible activité endonucléase, différents mutants ont été produits. Au niveau du motif LATLNDIERFL et afin d'identifier les acides aminés impliqués dans l'activité endonucléase et dans la dimérisation de pUL56, différents résidus conservés (L134, L137, D139, I140, E141, L144) ont été substitués par une alanine. Des combinaisons de mutations ont également été réalisées. Dans le domaine doigt de zinc les cystéines (C191, C194, C217, H219, H223) pouvant

être impliquées dans la liaison au zinc ont été substitués par une sérine et les histidines par une alanine. Le résidu conservé N203, au niveau de la boucle, a été substitué par une alanine. Enfin, afin de mettre en évidence l'implication d'un court fragment au sein de pUL56, une délétion, des mutations ponctuelles et des combinaisons de mutations ont été réalisées au niveau du domaine $_{671}\text{WMVVKYMGGFF}_{680}$. L'impact des différentes mutations ou délétions sur la capacité du virus à se répliquer a été évalué par transfection des BAC CMVH mutés dans des fibroblastes humains (MRC-5). Ainsi, la production de virus recombinants par la technologie des BAC portant une mutation ou des combinaisons de mutations ont permis, après transfection en cellules humaines, de montrer le caractère essentiel de ces motifs dans la réplication virale. En effet, au niveau du potentiel motif LATLNDIERFL, contrairement à la substitution du D139, celle du E141 bloque la réplication virale. La mutation des résidus leucine et isoleucine formant un hypothétique « *leucine zipper* » réduit la capacité du virus à produire de nouveaux virions infectieux et des combinaisons de mutations entraînent une incapacité du virus à produire des virions infectieux. Nous avons également identifié le motif de liaison au zinc impliquant les résidus cystéine et histidine au sein de la séquence C191-X₂-C194-X₂₂-C217-X-H219 (CCCH). Les mutations des acides aminés se trouvant à la base du motif doigt de zinc (C191S, C194S, C217S) bloquent la capacité du virus à produire de nouveaux virions et ainsi la capacité d'infection des cellules voisines. Ceci peut-être expliqué par une désorganisation du motif en l'absence des cystéines nécessaires à la structuration du motif. Par contraste, la mutation de résistance aux benzimidazolés Q204R située au sommet de la boucle du potentiel doigt de zinc n'entrave pas la capacité du virus recombinant à se répliquer. Lorsque le potentiel doigt de zinc a été décrit *in silico*, plusieurs hypothèses sur les acides aminés impliqués dans la structuration du doigt de zinc ont été formulées, impliquant deux ou trois cystéines et une ou deux histidines (**Champier et al., 2008**). Nos résultats suggèrent une structuration impliquant les trois cystéines et l'histidine 219. Les résultats contrastés entre les mutants de la boucle N203A et Q204R suggèrent un rôle important de la boucle, qui tolère cependant un certain degré de variabilité.

En accord avec ce qui est retrouvé chez les LAGLIDADG *Homing Endonuclease*, à travers le motif LATLNDIERFL, la protéine pUL56 pourrait former un dimère, permettant ainsi un rapprochement de deux glutamates (E141) potentiellement impliqués dans la coordination des ions divalents Mg^{2+} du site catalytique. Quelques acides aminés plus loin, on retrouve un

motif de fixation à l'ADN en doigt de zinc permettant probablement une stabilisation du complexe protéique sur l'ADN. Ces résultats ont fait l'objet d'un deuxième article « **Highlighting of a LAGLIDADG and a zinc finger motifs located in the pUL56 sequence crucial for HCMV replication** » en préparation pour soumission dans la revue « **PLOS Pathogens** ». La production de virus recombinants et l'utilisation de la technologies Alpha utilisant des protéines purifiées ont permis de valider le caractère essentiel d'une courte séquence ${}_{671}\text{WMVVKYMGFF}_{680}$ dans l'interaction de pUL56 avec son partenaire pUL89. Ces résultats ont fait l'objet d'un dépôt de brevet au sein de l'Office Européen des Brevet « **Antibodies and peptides to treat HCMV related diseases** » (Numéro de dépôt : EP17305987.4 ; Date de dépôt : 24-07-2017) et d'un troisième article « **Identification of a short sequence in the HCMV terminase pUL56 essential for interaction with pUL89 subunit** » parue dans la revue « **Scientific Reports** ».

Dans la perspective de réaliser différents tests fonctionnels, une production des protéines sauvages et mutées est nécessaire. Une production en cellules eucaryotes HEK293 suivie de purifications nous a notamment permis d'obtenir une quantité suffisante pour la mise au point de la technologie Alpha.

En plus des expériences permettant de démontrer une réelle activité endonucléase *in vitro*, des études permettant de s'assurer d'une dimérisation semblent indispensables. En effet, il est possible que les mutations puissent abolir la dimérisation de la protéine pUL56 et ainsi bloquer son activité. Après production et purification des protéines recombinantes, il est envisagé de réaliser des Western Blot en conditions non dénaturantes, afin de visualiser leur capacité à former des dimères. Par ailleurs, puisque le motif doigt de zinc pourrait intervenir dans la stabilisation du complexe au niveau de l'ADN, il devient nécessaire de réaliser des expériences permettant de visualiser la fixation des protéines recombinantes aux niveaux des séquences cibles « *pac* ». Pour cela, des techniques de retard sur gel EMSA (« *electrophoretic mobility shift assay* ») sont envisagées. Afin de conforter notre hypothèse et ces premiers résultats, l'impact des différentes mutations du domaine peut être étudié par observation des cellules transfectées en microscopie électronique afin d'observer l'aspect « *vide* » ou « *plein* » des néocapsides témoignant de l'encapsidation ou non du génome viral. Nous avons mis au point la technique pour le BAC CMVH sauvage et nous sommes en train d'étudier les cellules transfectées avec des BAC CMVH mutés au niveau des zones d'intérêt. La production de virus

recombinants et la technologie Alpha ont permis de valider le caractère essentiel du fragment pUL56(671-680) situé en C-terminal de pUL56 dans l'interaction avec son partenaire pUL89. De par la récente découverte de nouvelles protéines intervenant dans le processus d'encapsidation et interagissant avec le complexe terminase, il serait intéressant d'étudier l'implication de ces trois fragments dans l'interaction de pUL56 avec pUL51, pUL77 et pUL93, mais aussi avec les protéines portails pUL104.

Bien que le rôle fonctionnel de ces différents motifs reste à démontrer, ces résultats démontrent cependant leur caractère indispensable et valident le poids de ces différents résidus dans la réplication virale. Le caractère essentiel de ces motifs suggère qu'ils seraient nécessaires à la conformation de pUL56 et à sa fonction tels que la fixation à l'ADN et/ou son activité nucléase.

Le complexe hélicase-primase comme nouvelle cible

Le complexe hélicase-primase du CMVH est également un composant essentiel du processus de réplication. Ce complexe hétérotrimérique est composé de l'hélicase (pUL105), de la primase (pUL70) et du facteur associé (pUL102). Les contributions de chaque sous-unité aux activités biochimiques du complexe demeurent cependant incertaines.

La région en N-terminal (G-X4-GK-TS) qui fait partie du motif ATPase A (**Walker et al., 1982**) est présente dans de nombreuses protéines. D'après des études de cristallographie aux rayons X, cette région forme une boucle de liaison au phosphate (**Saraste et al., 1990**) (**Story and Steitz, 1992**). Dans la deuxième région, la cristallographie aux rayons X a montré que le premier résidu D est à proximité immédiate du motif ATPase A et lie un ion Mg^{2+} à travers une molécule d'eau (**Pai et al., 1990**) (**Story and Steitz, 1992**).

Ainsi, en utilisant des alignements de séquences protéiques et la construction d'un modèle théorique d'un fragment de pUL105 à partir d'une hélicase Upf1 humaine (PDB 2GJK), nous proposons une vue rapprochée des interactions du site de liaison de l'ATP avec des acides aminés. Nous avons également utilisé une approche mutationnelle en jouant sur la longueur de la chaîne latérale ou la nature du groupement fonctionnel de chaque résidu afin d'identifier les acides aminés impliqués dans l'interaction.

La chaîne latérale de l'aspartate 261 et de la thréonine 127 sont proche d'un ion Mg^{2+} constituant la poche catalytique du motif. Par conséquent, l'interaction électrostatique entre l'ion Mg^{2+} et la chaîne latérale du résidu muté peut avoir une incidence sur les distances entre les résidus catalytiques vers l'ion Mg^{2+} . Les résidus du motif I et II forment des interactions avec les phosphates β et γ de l'ATP via la chélation d'un ion Mg^{2+} . Nous proposons que la queue de polyphosphate se trouve dans une poche comportant plusieurs résidus (H82, G120, G123, K126, T127, D261, E262 et Q306) et stabilisée par la présence d'ions Mg^{2+} et de deux molécules d'eau.

De plus, après analyse des alignements de séquences protéiques des homologues de la primase virale pUL70, un motif de liaison à l'ADN semble être situé en C-terminal de pUL70. D'après nos résultats, les résidus C881, H886, C915 et C920 font partie d'un motif de liaison à l'ADN riche en cystéines qui semble être essentiel pour la structure et la fonction pUL70.

Ainsi, nous avons identifié plusieurs acides aminés cruciaux pour la réplication virale. Ces résultats ont fait l'objet d'un quatrième article « ***Identification of essential residues in the HCMV helicase-primase complex for viral replication*** » en préparation pour soumission dans la revue « ***Nature Communications*** ».

De la même façon que précédemment et dans la perspective de réaliser différents tests fonctionnels, une production des protéines sauvages et mutées en cellules eucaryotes H293 suivie d'une purification est nécessaire. Un test ATPase est envisagé pour les protéines pUL105 mutées au niveau du motif de fixation de l'ATP. Comme pour pUL56, des techniques de retard sur gel EMSA (« *electrophoretic mobility shift assay* ») sont envisagées afin de visualiser un défaut d'interaction des protéines pUL70 mutées au niveau du potentiel doigt de zinc.

Bien que le rôle fonctionnel de ces deux motifs reste à démontrer, l'ensemble de ces résultats montrent déjà le caractère essentiel de ces résidus pour la réplication virale.

Vers le développement de nouvelles thérapies

Le caractère essentiel des différents motifs mis en évidence au cours de ce travail en fait de potentielles cibles pour le traitement de l'infection à CMVH, pour le développement d'un futur vaccin. Comme discuté précédemment, le complexe terminase représente une

cible virale de choix. En effet, ce complexe est indispensable à la réplication en participant à l'encapsidation du génome viral et il n'existe pas d'homologues cellulaires.

Si le fragment LATLNDIERFL situé en N-terminal de pUL56 intervient dans l'interface permettant la dimérisation de pUL56, des anticorps (chimères, monoclonaux ou polyclonaux) dirigés contre la séquence pourraient entraver la dimérisation de pUL56. De la même façon des anticorps dirigés contre la séquence WMVVKYMGGFF pourrait être utile pour bloquer l'interaction de pUL56 et pUL89. Nous pourrions également envisager l'utilisation de plusieurs combinaisons d'anticorps.

Des peptides comprenant la séquence LATLNDIERFL ou dérivés de cette séquence ou des peptides comprenant la séquence WMVVKYMGGFF ou dérivés de cette même séquence pourraient aussi être envisagés. Ainsi, ces peptides ou dérivés en excès pourraient servir de leurre moléculaire et ainsi entraver la réplication virale en bloquant l'interaction de deux monomères de pUL56 ou l'interaction de la sous-unité pUL56 avec son partenaire pUL89. De la même manière que pour les anticorps, nous pourrions également envisager l'utilisation de plusieurs combinaisons de peptides. En effet, bien que les résidus W671 et F679, montrés comme étant essentiels à la réplication virale, sont parfaitement conservés, les résidus Y676 et F680 du segment WMVVKYMGGFF sont substitués respectivement par un F et un Y chez certains herpès virus. Ainsi, le peptide pourrait comprendre la séquence suivante W-Xaa1-Xaa2-Xaa3-Xaa4-Xaa5-Xaa6-Xaa7-F-Xaa8, où Xaa1, Xaa2, Xaa3, Xaa4, Xaa6 et Xaa7 est un des acides aminés suivant alanine (A), arginine (R), asparagine (N), aspartate (D), cystéine (C), glutamate (E), glutamine (Q), glycine (G), histidine (H), isoleucine (I), leucine (L), lysine (K), méthionine (M), phenylalanine (F), proline (P), serine (S), threonine (T), tryptophane (W), tyrosine (Y), valine (V), un acide aminé non naturel ou un acide aminé modifié chimiquement (par réaction d'un groupe latéral fonctionnel) et Xaa5 et Xaa8 est soit une phenylalanine (F) soit une tyrosine (Y). Ainsi, Les acides aminés autres que ceux indiqués comme conservés peuvent être remplacé par un acide aminé ayant des propriétés similaires (polarité, potentiel de liaison hydrogène, acide, basique, hydrophobe, aromatique). Ces acides aminés non naturels ou modifiés chimiquement peuvent être utilisés afin de contrôler et stabiliser les structures secondaires des peptides. De la même façon, pour le fragment LATLNDIERFL situé en N-terminal de la sous-unité pUL56, nous pourrions développer différentes combinaisons de peptides en conservant les résidus leucine et isoleucine participant probablement à

l'interface du dimère de pUL56. Nous pourrions également envisager d'apporter une étiquette (Tag) en N ou C-terminal des peptides afin de réaliser différents essais d'immunomarquages, Western Blot.

Nous pourrions également envisager de faire appel à des start-up pour faire du « *drug design* ». Ainsi, le développement d'une molécule ciblant le potentiel doigt de zinc situé en N-terminale de pUL56 pourrait potentiellement entraver l'interaction de pUL56 avec l'ADN viral et par conséquent l'encapsidation du génome virale. De la même façon que précédemment, une molécule ciblant la séquence LATLNDIERFL ou WMVVKYMGGFF pourrait respectivement bloquer la dimérisation de pUL56 et l'interaction des sous-unités pUL56 et pUL89. Néanmoins, une structure tridimensionnelle de pUL56 serait probablement nécessaire pour la conception de molécules. En effet, elle permettrait de visualiser la conformation et l'arrangement dans l'espace de ces différents motifs.

Suite au dépôt de brevet au sein de l'Office Européen des Brevet « **Antibodies and peptides to treat HCMV related diseases** » (Numéro de dépôt : EP17305987.4 ; Date de dépôt : 24-07-2017), nous envisageons de faire produire des anticorps et des peptides afin de réaliser une première preuve de concept en culture cellulaire et sur des explants placentaires. En effet, au laboratoire, nous avons développé la culture de différents types cellulaires (fibroblastiques, endothéliales, épithéliales et neurales), un modèle *ex vivo* d'explants placentaires humains (premier et troisième trimestres) et un modèle *in vivo*. Ce modèle *ex vivo* mime l'infection grâce à une matrice fibroblastique et une éponge de gélatine sur laquelle est déposée l'explant placentaire (Morère et al., 2015). De par la stricte spécificité d'espèce du CMV, la mise en place d'un modèle animal classique est difficile. Néanmoins, pour l'étude du CMVH, une souris immunodéficiente SCID humanisées a été développée au laboratoire (xéno greffes d'explants placentaires humains infectés par différentes souches virales). Ce modèle permet notamment l'étude de l'efficacité et de la toxicité de nouvelles molécules antivirales *in vivo*.

Dans un premier temps et afin de vérifier si les peptides nouvellement générés sont encore capables de perturber l'interaction de pUL56 avec pUL89 du CMVH, un essai Alpha devra être effectué avec chaque peptide. Par la suite, un comptage de la réduction du nombre de foyers d'infection dans des plaques 48 puits sera réalisé pour mesurer la concentration de peptides requis pour réduire le nombre de foyers de 50% par rapport aux témoins pour

déterminer l'IC50. Concernant les anticorps, des essais de neutralisation en cultures cellulaires pourront être effectués. En parallèles, des tests sur la toxicité devront être effectués.

Ces anticorps, peptides et molécules pourraient être utilisés en prophylaxie, pour un traitement curatif ou en diagnostic. En effet, nous pourrions envisager une utilisation de ces composés pour empêcher la transmission materno-fœtale lors d'une primo-infection, pour réduire le risque de transmission d'un donneur infecté à un receveur séronégatif ou encore dans le traitement de maladies apparentées à CMVH. La composition pourrait être associée à d'autres molécules comme les inhibiteurs de la polymérase virale pUL54 (ganciclovir, valganciclovir, cidofovir, forcartet) ou d'autres molécules tel que l'artésunate et ses dérivés, l'everolimus, le léflunomide, ou de nouvelles molécules tels que le maribavir ou d'autres agents ciblant la kinase virale pUL97, le letermovir ou d'autres molécules ciblant le complexe terminase. Il faudra néanmoins tester la toxicité de ces différentes combinaisons et l'effet de leur association (synergique, additif ou antagoniste).

Bien que le complexe hélicase-primase ne soit pas une cible de choix puisqu'il existe des homologues cellulaires, deux molécules ciblant le complexe hélicase-primase de l'herpès de type 1 et 2 sont en cours de développement (pritelivir et amenamevir). Par conséquent, nous pouvons penser que les deux motifs identifiés au sein de l'hélicase et de la primase du CMVH peuvent devenir de nouvelles cibles virales.

Vers une meilleure compréhension du mécanisme d'action de molécules en développement

Enfin, la compréhension de la relation structure-fonction de ces différents complexes pourrait permettre de mieux appréhender le mécanisme de molécules en développement comme le letermovir.

Comme abordé dans la revue « ***Human cytomegalovirus terminase complex as an antiviral target, a close up view*** », contrairement à d'autres inhibiteurs de l'encapsidation du génome viral, le letermovir est spécifique du CMVH. Le manque d'activité contre d'autres herpès virus, qui sont généralement détectés chez les patients immunodéprimés, est une limitation réelle de l'utilisation letermovir en clinique (**Marschall et al., 2012**). Ces résultats indiquent un mécanisme d'action distinct des autres inhibiteurs de l'encapsidation du génome

viral qui sont moins spécifiques et efficaces que letermovir pour le traitement de l'infection à CMVH. Une possible explication pourrait provenir d'une évolution divergente des sous-unités du complexe terminase des herpès virus.

Comme discuté dans la revue « ***Human cytomegalovirus terminase complex as an antiviral target, a close up view*** », afin de mieux comprendre la spécificité du letermovir pour le CMVH, nous avons étudié la localisation des mutations de résistance au letermovir liées aux domaines conservés de pUL56 identifiés par (**Champier et al., 2008**). L'impact potentiel des polymorphismes de pUL56 sur la susceptibilité au letermovir a récemment été étudié à l'aide d'un panel de 74 isolats cliniques (**Lischka et al., 2016**). Les auteurs ont confirmé que la majorité des polymorphismes identifiés étaient situés dans les deux régions variables de pUL56 mais, surtout, qu'aucune n'était située dans la région de résistance au letermovir (AA230 à AA370). Cela suggère fortement que tous les résidus connus pour être associés à une résistance au letermovir sont fortement conservés. Néanmoins, ils ne sont pas toujours situés dans des domaines conservés. La substitution R369M/G/S conférant une résistance de haut niveau au letermovir est située dans la région conservée VI (**Goldner et al., 2014**). Parmi les herpès virus, le résidu R369 n'a été trouvé qu'au niveau du CMVH et de l'HHV-6_B. Chez d'autres herpès virus, l'arginine est substituée par un aspartate (HSV-1, HSV-2, HHV-4_1 et HHV-4_2), une asparagine (HHV-6A-GS), une serine (HHV-3) ou encore une lysine (MCMV et RCMV). Ces substitutions pourraient probablement expliquer le manque d'efficacité du letermovir pour ces herpès virus. Contrairement à d'autres herpès virus, HHV-6_B possède également une arginine en position 369 mais, à ce jour, la sensibilité de l'HHV-6_B au letermovir n'a pas été testée et ceci devrait être confirmé par des essais antiviraux. Le manque d'activité associé à la substitution de la sérine peut être dû au changement de taille de l'acide aminé. Une hypothèse pour l'aspartate est la présence d'une charge négative. La présence d'une chaîne latérale plus courte peut expliquer le manque d'activité avec la substitution par de l'arginine par une asparagine. Nous avons également regardé les autres positions des mutations de résistance au letermovir. Il est intéressant de constater que la plupart des résidus impliqués dans la résistance ont été trouvés chez d'autres herpès virus tels que l'HSV-1 ou HSV-2. Par exemple, la substitution L241P (CMVH) qui confère une résistance au letermovir a également été trouvée chez tous les alphaherpès virus et a été remplacée par un G dans d'autres betaherpès virus. Il pourrait être intéressant d'étudier la capacité relative

d'émergence de ces mutations dans un contexte clinique. En effet, étant donné que ces mutations existent déjà chez d'autres herpès virus, il pourrait y avoir un avantage pour la sélection de ces substitutions lors de la réplication virale en contexte clinique. Ainsi, la divergence des séquences protéiques et donc la conformation des sous-unités du complexe terminase pourrait probablement expliquer la spécificité du letermovir pour le CMVH.

Bien que les premières études indiquent que le letermovir agirait plus particulièrement sur la sous-unité pUL56 du complexe terminase, son site d'action n'est pas encore réellement élucidé. Récemment Sunwen Chou (Oregon Health & Science University, Portland, USA) a montré que des mutations de résistance au letermovir étaient détectées au niveau des trois principales sous-unités du complexe terminase (pUL56-pUL89-pUL51). Cela suggère que le letermovir inhibe une fonction biologique impliquant une interaction des trois sous-unités et que des régions d'interactions de pUL56 et de pUL89 sont proches d'un site de liaison de petites molécules, comme le letermovir.

Par conséquent, une première hypothèse du mécanisme d'action du letermovir est que par sa fixation à pUL56, il entrave ou perturbe l'interaction entre pUL56 et ses différents partenaires ou avec l'ADN. Afin de visualiser l'impact du letermovir sur les interactions entre les sous-unités du complexe terminase, il est envisagé de réaliser des essais d'interaction par la technologie Alpha, mise au point au cours de notre travail de doctorat, en présence et en absence du letermovir. Ainsi, nous pourrions visualiser l'impact du letermovir sur l'interaction entre les différents partenaires du complexe pris deux à deux. Par ailleurs, nous envisageons de tester la capacité répliquative de différents virus recombinants portant des mutations au niveau des différentes sous-unités (pUL56, pUL89 et pUL51) séparément et en association.

Pris dans l'ensemble ces travaux ont tout d'abord permis d'augmenter le nombre de mutations de résistances caractérisées mais aussi de mieux appréhender la relation structure fonction de deux complexes protéiques appuyant les données existantes les présentant comme de nouvelles cibles anti-CMVH. A long terme, ces nouvelles données permettront peut-être de développer des anticorps, des peptides ou des molécules à visée préventives, thérapeutique, vaccinale ou diagnostic mais aussi de mieux comprendre le mécanisme d'action de molécules en développement et leur barrière génétique.

REFERENCES

Adler, S.P., Manganello, A.-M., Lee, R., McVoy, M.A., Nixon, D.E., Plotkin, S., Mocarski, E., Cox, J.H., Fast, P.E., Nesterenko, P.A., et al. (2016). A Phase 1 Study of 4 Live, Recombinant Human Cytomegalovirus Towne/Toledo Chimera Vaccines in Cytomegalovirus-Seronegative Men. *J. Infect. Dis.* *214*, 1341–1348.

Alain, S., Revest, M., Veyer, D., Essig, M., Rerolles, J.P., Rawlinson, W., Mengelle, C., Huynh, A., Kamar, N., Garrigue, I., et al. (2013). Maribavir use in practice for cytomegalovirus infection in French transplantation centers. *Transplant. Proc.* *45*, 1603–1607.

Andouard, D., Mazon, M.-C., Ligat, G., Couvreur, A., Pouteil-Noble, C., Cahen, R., Yasdanpanah, Y., Deering, M., Viget, N., Alain, S., et al. (2016). Contrasting effect of new HCMV pUL54 mutations on antiviral drug susceptibility: Benefits and limits of 3D analysis. *Antiviral Res.* *129*, 115–119.

Appleton, B.A., Brooks, J., Loregian, A., Filman, D.J., Coen, D.M., and Hogle, J.M. (2006). Crystal structure of the cytomegalovirus DNA polymerase subunit UL44 in complex with the C terminus from the catalytic subunit. Differences in structure and function relative to unliganded UL44. *J. Biol. Chem.* *281*, 5224–5232.

Avery, R.K., Marty, F.M., Strasfeld, L., Lee, I., Arrieta, A., Chou, S., Tatarowicz, W., and Villano, S. (2010). Oral maribavir for treatment of refractory or resistant cytomegalovirus infections in transplant recipients. *Transpl. Infect. Dis. Off. J. Transplant. Soc.* *12*, 489–496.

Baek, M.-C., Krosky, P.M., and Coen, D.M. (2002). Relationship between autophosphorylation and phosphorylation of exogenous substrates by the human cytomegalovirus UL97 protein kinase. *J. Virol.* *76*, 11943–11952.

Barnard, E.C., Brown, G., and Stow, N.D. (1997). Deletion mutants of the herpes simplex virus type 1 UL8 protein: effect on DNA synthesis and ability to interact with and influence the intracellular localization of the UL5 and UL52 proteins. *Virology* *237*, 97–106.

Bentz, G.L., and Yurochko, A.D. (2008). Human CMV infection of endothelial cells induces an angiogenic response through viral binding to EGF receptor and beta1 and beta3 integrins. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *105*, 5531–5536.

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

Biron, K.K., Harvey, R.J., Chamberlain, S.C., Good, S.S., Smith, A.A., Davis, M.G., Talarico, C.L., Miller, W.H., Ferris, R., Dornsife, R.E., et al. (2002). Potent and selective inhibition of human cytomegalovirus replication by 1263W94, a benzimidazole L-riboside with a unique mode of action. *Antimicrob. Agents Chemother.* *46*, 2365–2372.

Biswas, N., and Weller, S.K. (1999). A mutation in the C-terminal putative Zn²⁺ finger motif of UL52 severely affects the biochemical activities of the HSV-1 helicase-primase subcomplex. *J. Biol. Chem.* *274*, 8068–8076.

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

Bogner, E., Radsak, K., and Stinski, M.F. (1998). The gene product of human cytomegalovirus open reading frame UL56 binds the pac motif and has specific nuclease activity. *J. Virol.* *72*, 2259–2264.

Borst, E.M., Wagner, K., Binz, A., Sodeik, B., and Messerle, M. (2008). The essential human cytomegalovirus gene UL52 is required for cleavage-packaging of the viral genome. *J. Virol.* *82*, 2065–2078.

Borst, E.M., Kleine-Albers, J., Gabaev, I., Babic, M., Wagner, K., Binz, A., Degenhardt, I., Kalesse, M., Jonjic, S., Bauerfeind, R., et al. (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.

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. (2016). The Essential Human Cytomegalovirus Proteins pUL77 and pUL93 are Structural Components Necessary for Viral Genome Encapsidation. *J. Virol.*

Bresson, J.L., Clavequin, M.C., Mazon, M.C., Mengelle, C., Scieux, C., Segondy, M., Houhou, N., and Fédération Française des CECOS (2003). Risk of cytomegalovirus transmission by cryopreserved semen: a study of 635 semen samples from 231 donors. *Hum. Reprod. Oxf. Engl.* *18*, 1881–1886.

Chaer, F. El, Shah, D.P., and Chemaly, R.F. (2016). How I treat resistant cytomegalovirus infection in hematopoietic cell transplantation recipients. *Blood* *128*, 2624–2636.

Champier, G., Hantz, S., Couvreur, A., Stuppfler, S., Mazon, M.-C., Bouaziz, S., Denis, F., and 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.

Champier, G., Couvreur, A., Hantz, S., Rametti, A., Mazon, M.-C., Bouaziz, S., Denis, F., and Alain, S. (2008). Putative functional domains of human cytomegalovirus pUL56 involved in dimerization and benzimidazole D-ribonucleoside activity. *Antivir. Ther.* *13*, 643–654.

Chee, M.S., Lawrence, G.L., and Barrell, B.G. (1989). Alpha-, beta- and gammaherpesviruses encode a putative phosphotransferase. *J. Gen. Virol.* *70 (Pt 5)*, 1151–1160.

Chen, Y., Livingston, C.M., Carrington-Lawrence, S.D., Bai, P., and Weller, S.K. (2007). A mutation in the human herpes simplex virus type 1 UL52 zinc finger motif results in defective primase activity but can recruit viral polymerase and support viral replication efficiently. *J. Virol.* *81*, 8742–8751.

Cheng, Z., Muhrad, D., Lim, M.K., Parker, R., and Song, H. (2007). Structural and functional insights into the human Upf1 helicase core. *EMBO J.* *26*, 253–264.

Chevalier, B.S., Monnat, R.J., and Stoddard, B.L. (2001). The homing endonuclease I-Crel uses three metals, one of which is shared between the two active sites. *Nat. Struct. Biol.* *8*, 312–316.

Chono, K., Katsumata, K., Kontani, T., Kobayashi, M., Sudo, K., Yokota, T., Konno, K., Shimizu, Y., and Suzuki, H. (2010). ASP2151, a novel helicase-primase inhibitor, possesses antiviral activity against varicella-zoster virus and herpes simplex virus types 1 and 2. *J. Antimicrob. Chemother.* *65*, 1733–1741.

Chothia, C., and Lesk, A.M. (1986). The relation between the divergence of sequence and structure in proteins. *EMBO J.* *5*, 823–826.

Chou, S. (2017). Comparison of Cytomegalovirus Terminase Gene Mutations Selected after Exposure to Three Distinct Inhibitor Compounds. *Antimicrob. Agents Chemother.*

Chou, S., Wechel, L.C.V., and Marousek, G.I. (2007). Cytomegalovirus UL97 kinase mutations that confer maribavir resistance. *J. Infect. Dis.* *196*, 91–94.

Chou, S., Marousek, G., Auerochs, S., Stamminger, T., Milbradt, J., and Marschall, M. (2011).

The unique antiviral activity of artesunate is broadly effective against human cytomegaloviruses including therapy-resistant mutants. *Antiviral Res.* **92**, 364–368.

Chou, S., Marousek, G., and Bowlin, T.L. (2012). Cyclopropavir susceptibility of cytomegalovirus DNA polymerase mutants selected after antiviral drug exposure. *Antimicrob. Agents Chemother.* **56**, 197–201.

Chou, S., Ercolani, R.J., Marousek, G., and Bowlin, T.L. (2013). Cytomegalovirus UL97 Kinase Catalytic Domain Mutations That Confer Multidrug Resistance. *Antimicrob. Agents Chemother.* **57**, 3375–3379.

Chulay, J., Biron, K., Wang, L., Underwood, M., Chamberlain, S., Frick, L., Good, S., Davis, M., Harvey, R., Townsend, L., et al. (1999). Development of novel benzimidazole riboside compounds for treatment of cytomegalovirus disease. *Adv. Exp. Med. Biol.* **458**, 129–134.

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

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

Couvreux, A., Hantz, S., Marquant, R., Champier, G., Alain, S., Morellet, N., and Bouaziz, S. (2010). Insight into the structure of the pUL89 C-terminal domain of the human cytomegalovirus terminase complex. *Proteins* **78**, 1520–1530.

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

DeRussy, B.M., and Tandon, R. (2015). Human cytomegalovirus pUL93 is required for viral genome cleavage and packaging. *J. Virol.*

DeRussy, B.M., Boland, M.T., and Tandon, R. (2016). Human Cytomegalovirus pUL93 Links Nucleocapsid Maturation and Nuclear Egress. *J. Virol.*

Dracheva, S., Koonin, E.V., and Crute, J.J. (1995). Identification of the primase active site of the herpes simplex virus type 1 helicase-primase. *J. Biol. Chem.* **270**, 14148–14153.

- Dreyer, C., Sablin, M.-P., Faivre, S., and Raymond, E. (2009). [Topics in mTOR pathway and its inhibitors]. *Bull. Cancer (Paris)* *96*, 87–94.
- Dropulic, L.K., and Cohen, J.I. (2010). Update on new antivirals under development for the treatment of double-stranded DNA virus infections. *Clin. Pharmacol. Ther.* *88*, 610–619.
- Ducancelle, A., Champier, G., Alain, S., Petit, F., Le Pors, M.-J.S., and Mazon, M.-C. (2006). A novel mutation in the UL54 gene of human cytomegalovirus isolates that confers resistance to foscarnet. *Antivir. Ther.* *11*, 537–540.
- Elek, S.D., and Stern, H. (1974). Development of a vaccine against mental retardation caused by cytomegalovirus infection in utero. *Lancet Lond. Engl.* *1*, 1–5.
- Erice, A. (1999). Resistance of human cytomegalovirus to antiviral drugs. *Clin. Microbiol. Rev.* *12*, 286–297.
- Evers, D.L., Komazin, G., Ptak, R.G., Shin, D., Emmer, B.T., Townsend, L.B., and Drach, J.C. (2004). Inhibition of human cytomegalovirus replication by benzimidazole nucleosides involves three distinct mechanisms. *Antimicrob. Agents Chemother.* *48*, 3918–3927.
- Falkenberg, M., Bushnell, D.A., Elias, P., and Lehman, I.R. (1997). The UL8 subunit of the heterotrimeric herpes simplex virus type 1 helicase-primase is required for the unwinding of single strand DNA-binding protein (ICP8)-coated DNA substrates. *J. Biol. Chem.* *272*, 22766–22770.
- Feire, A.L., Koss, H., and Compton, T. (2004). Cellular integrins function as entry receptors for human cytomegalovirus via a highly conserved disintegrin-like domain. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *101*, 15470–15475.
- Freemont, P.S., Friedman, J.M., Beese, L.S., Sanderson, M.R., and Steitz, T.A. (1988). Cocrystal structure of an editing complex of Klenow fragment with DNA. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *85*, 8924–8928.
- Giesen, K., Radsak, K., and 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 alpha. *J. Gen. Virol.* *81*, 2231–2244.
- Gilbert, C., and Boivin, G. (2005a). Human cytomegalovirus resistance to antiviral drugs. *Antimicrob. Agents Chemother.* *49*, 873–883.

- Gilbert, C., and Boivin, G. (2005b). New reporter cell line to evaluate the sequential emergence of multiple human cytomegalovirus mutations during in vitro drug exposure. *Antimicrob. Agents Chemother.* *49*, 4860–4866.
- Gilbert, C., Azzi, A., Goyette, N., Lin, S.-X., and Boivin, G. (2011). Recombinant phenotyping of cytomegalovirus UL54 mutations that emerged during cell passages in the presence of either ganciclovir or foscarnet. *Antimicrob. Agents Chemother.* *55*, 4019–4027.
- Goldner, T., Hewlett, G., Ettischer, N., Ruebsamen-Schaeff, H., Zimmermann, H., and 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.
- Goldner, T., Hempel, C., Ruebsamen-Schaeff, H., Zimmermann, H., and Lischka, P. (2014). Geno- and phenotypic characterization of human cytomegalovirus mutants selected in vitro after letermovir (AIC246) exposure. *Antimicrob. Agents Chemother.* *58*, 610–613.
- Graves-Woodward, K.L., Gottlieb, J., Challberg, M.D., and Weller, S.K. (1997). Biochemical analyses of mutations in the HSV-1 helicase-primase that alter ATP hydrolysis, DNA unwinding, and coupling between hydrolysis and unwinding. *J. Biol. Chem.* *272*, 4623–4630.
- Hanks, S.K., Quinn, A.M., and Hunter, T. (1988). The protein kinase family: conserved features and deduced phylogeny of the catalytic domains. *Science* *241*, 42–52.
- Hantz, S., Cotin, S., Borst, E., Couvreur, A., Salmier, A., Garrigue, I., Merville, P., Mengelle, C., Attal, M., Messerle, M., et al. (2013). Novel DNA polymerase mutations conferring cytomegalovirus resistance: input of BAC-recombinant phenotyping and 3D model. *Antiviral Res.* *98*, 130–134.
- He, Z., He, Y.S., Kim, Y., Chu, L., Ohmstede, C., Biron, K.K., and Coen, D.M. (1997). The human cytomegalovirus UL97 protein is a protein kinase that autophosphorylates on serines and threonines. *J. Virol.* *71*, 405–411.
- Heineman, T.C., Schleiss, M., Bernstein, D.I., Spaete, R.R., Yan, L., Duke, G., Prichard, M., Wang, Z., Yan, Q., Sharp, M.A., et al. (2006). A phase 1 study of 4 live, recombinant human cytomegalovirus Towne/Toledo chimeric vaccines. *J. Infect. Dis.* *193*, 1350–1360.
- Hodson, E.M., Jones, C.A., Webster, A.C., Strippoli, G.F.M., Barclay, P.G., Kable, K.,

Vimalachandra, D., and 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. *Lancet Lond. Engl.* *365*, 2105–2115.

Hutterer, C., Niemann, I., Milbradt, J., Fröhlich, T., Reiter, C., Kadioglu, O., Bahsi, H., Zeitträger, I., Wagner, S., Einsiedel, J., et al. (2015). The broad-spectrum anti-infective drug artesunate interferes with the canonical nuclear factor kappa B (NF- κ B) pathway by targeting RelA/p65. *Antiviral Res.* *124*, 101–109.

Hwang, J.-S., and Bogner, E. (2002). ATPase activity of the terminase subunit pUL56 of human cytomegalovirus. *J. Biol. Chem.* *277*, 6943–6948.

Kapranos, N., Petrakou, E., Anastasiadou, C., and Kotronias, D. (2003). Detection of herpes simplex virus, cytomegalovirus, and Epstein-Barr virus in the semen of men attending an infertility clinic. *Fertil. Steril.* *79 Suppl 3*, 1566–1570.

Kaptein, S.J.F., Efferth, T., Leis, M., Rechter, S., Auerochs, S., Kalmer, M., Bruggeman, C.A., Vink, C., Stamminger, T., and Marschall, M. (2006). The anti-malaria drug artesunate inhibits replication of cytomegalovirus in vitro and in vivo. *Antiviral Res.* *69*, 60–69.

Kinzler, E.R., and Compton, T. (2005). Characterization of human cytomegalovirus glycoprotein-induced cell-cell fusion. *J. Virol.* *79*, 7827–7837.

Klinedinst, D.K., and Challberg, M.D. (1994). Helicase-primase complex of herpes simplex virus type 1: a mutation in the UL52 subunit abolishes primase activity. *J. Virol.* *68*, 3693–3701.

Komazin, G., Ptak, R.G., Emmer, B.T., Townsend, L.B., and Drach, J.C. (2003). Resistance of human cytomegalovirus to the benzimidazole L-ribonucleoside maribavir maps to UL27. *J. Virol.* *77*, 11499–11506.

Köppen-Rung, P., Dittmer, A., and Bogner, E. (2016). Intracellular distributions of capsid-associated pUL77 of HCMV and interactions with packaging proteins and pUL93. *J. Virol.*

Koszalka, G.W., Johnson, N.W., Good, S.S., Boyd, L., Chamberlain, S.C., Townsend, L.B., Drach, J.C., and Biron, K.K. (2002). Preclinical and toxicology studies of 1263W94, a potent and selective inhibitor of human cytomegalovirus replication. *Antimicrob. Agents Chemother.* *46*, 2373–2380.

Kotton, C.N., Kumar, D., Caliendo, A.M., Asberg, A., Chou, S., Danziger-Isakov, L., Humar, A.,

and Transplantation Society International CMV Consensus Group (2013). Updated international consensus guidelines on the management of cytomegalovirus in solid-organ transplantation. *Transplantation* 96, 333–360.

Kouzarides, T., Bankier, A.T., Satchwell, S.C., Weston, K., Tomlinson, P., and Barrell, B.G. (1987). Sequence and transcription analysis of the human cytomegalovirus DNA polymerase gene. *J. Virol.* 61, 125–133.

Krosky, P.M., Underwood, M.R., Turk, S.R., Feng, K.W., Jain, R.K., Ptak, R.G., Westerman, A.C., Biron, K.K., Townsend, L.B., and Drach, J.C. (1998). Resistance of human cytomegalovirus to benzimidazole ribonucleosides maps to two open reading frames: UL89 and UL56. *J. Virol.* 72, 4721–4728.

Krosky, P.M., Baek, M.-C., and Coen, D.M. (2003a). The human cytomegalovirus UL97 protein kinase, an antiviral drug target, is required at the stage of nuclear egress. *J. Virol.* 77, 905–914.

Krosky, P.M., Baek, M.-C., Jahng, W.J., Barrera, I., Harvey, R.J., Biron, K.K., Coen, D.M., and Sethna, P.B. (2003b). The human cytomegalovirus UL44 protein is a substrate for the UL97 protein kinase. *J. Virol.* 77, 7720–7727.

Landolfo, S., Gariglio, M., Gribaudo, G., and Lembo, D. (2003). The human cytomegalovirus. *Pharmacol. Ther.* 98, 269–297.

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

Lischka, P., Michel, D., and Zimmermann, H. (2016). Characterization of Cytomegalovirus Breakthrough Events in a Phase 2 Prophylaxis Trial of Letemovir (AIC246, MK 8228). *J. Infect. Dis.* 213, 23–30.

Liu, S., Knafels, J.D., Chang, J.S., Waszak, G.A., Baldwin, E.T., Deibel, M.R., Thomsen, D.R., Homa, F.L., Wells, P.A., Tory, M.C., et al. (2006). Crystal structure of the herpes simplex virus 1 DNA polymerase. *J. Biol. Chem.* 281, 18193–18200.

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

Lyss, G., Knorre, A., Schmidt, T.J., Pahl, H.L., and Merfort, I. (1998). The anti-inflammatory sesquiterpene lactone helenalin inhibits the transcription factor NF-kappaB by directly

targeting p65. *J. Biol. Chem.* *273*, 33508–33516.

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

Marschall, M., Stamminger, T., Urban, A., Wildum, S., Ruebsamen-Schaeff, H., Zimmermann, H., and Lischka, P. (2012). In vitro evaluation of the activities of the novel anticytomegalovirus compound AIC246 (letermovir) against herpesviruses and other human pathogenic viruses. *Antimicrob. Agents Chemother.* *56*, 1135–1137.

Marty, F.M., Ljungman, P., Papanicolaou, G.A., Winston, D.J., Chemaly, R.F., Strasfeld, L., Young, J.-A.H., Rodriguez, T., Maertens, J., Schmitt, M., et al. (2011). Maribavir prophylaxis for prevention of cytomegalovirus disease in recipients of allogeneic stem-cell transplants: a phase 3, double-blind, placebo-controlled, randomised trial. *Lancet Infect. Dis.* *11*, 284–292.

Mazeron, M.C., Alain, S., Leruez-Ville, M., and Schnepf, N. (2015). Infections à cytomégalo­virus. *EMC - Mal. Infect.* *12(4)*, 1–16.

McVoy, M.A., and Adler, S.P. (1994). Human cytomegalovirus DNA replicates after early circularization by concatemer formation, and inversion occurs within the concatemer. *J. Virol.* *68*, 1040–1051.

Mercorelli, B., Sinigalia, E., Loregian, A., and Palù, G. (2008). Human cytomegalovirus DNA replication: antiviral targets and drugs. *Rev. Med. Virol.* *18*, 177–210.

Michel, D., Schaarschmidt, P., Wunderlich, K., Heuschmid, M., Simoncini, L., Mühlberger, D., Zimmermann, A., Pavić, I., and Mertens, T. (1998). Functional regions of the human cytomegalovirus protein pUL97 involved in nuclear localization and phosphorylation of ganciclovir and pUL97 itself. *J. Gen. Virol.* *79 (Pt 9)*, 2105–2112.

Michel, D., Kramer, S., Höhn, S., Schaarschmidt, P., Wunderlich, K., and Mertens, T. (1999). Amino acids of conserved kinase motifs of cytomegalovirus protein UL97 are essential for autophosphorylation. *J. Virol.* *73*, 8898–8901.

Morère, L., Andouard, D., Labrousse, F., Saade, F., Calliste, C.-A., Cotin, S., Aubard, Y., Rawlinson, W.D., Esclaire, F., Hantz, S., et al. (2015). Ex vivo model of congenital cytomegalovirus infection and new combination therapies. *Placenta* *36*, 41–47.

- Nadal, M., Mas, P.J., Blanco, A.G., Arnan, C., Solà, M., Hart, D.J., and Coll, M. (2010). Structure and inhibition of herpesvirus DNA packaging terminase nuclease domain. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *107*, 16078–16083.
- Nashan, B., Gaston, R., Emery, V., Säemann, M.D., Mueller, N.J., Couzi, L., Dantal, J., Shihab, F., Mulgaonkar, S., Seun Kim, Y., et al. (2012). Review of cytomegalovirus infection findings with mammalian target of rapamycin inhibitor-based immunosuppressive therapy in de novo renal transplant recipients. *Transplantation* *93*, 1075–1085.
- Neff, B.J., Weibel, R.E., Buynak, E.B., McLean, A.A., and Hilleman, M.R. (1979). Clinical and laboratory studies of live cytomegalovirus vaccine Ad-169. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med. Soc. Exp. Biol. Med. N. Y. N* *160*, 32–37.
- Nelson, C.T., and Demmler, G.J. (1997). Cytomegalovirus infection in the pregnant mother, fetus, and newborn infant. *Clin. Perinatol.* *24*, 151–160.
- Neuber, S., Wagner, K., Goldne, T., Lischka, P., Steinbrueck, L., Messerle, M., and Borst, E.M. (2017). Mutual Interplay between the Human Cytomegalovirus Terminase Subunits pUL51, pUL56, and pUL89 promotes Terminase Complex Formation. *J. Virol.*
- Pai, E.F., Krengel, U., Petsko, G.A., Goody, R.S., Kabsch, W., and Wittinghofer, A. (1990). Refined crystal structure of the triphosphate conformation of H-ras p21 at 1.35 Å resolution: implications for the mechanism of GTP hydrolysis. *EMBO J.* *9*, 2351–2359.
- Pass, R.F., and Hutto, C. (1986). Group day care and cytomegaloviral infections of mothers and children. *Rev. Infect. Dis.* *8*, 599–605.
- Pass, R.F., Stagno, S., Dworsky, M.E., Smith, R.J., and Alford, C.A. (1982). Excretion of cytomegalovirus in mothers: observations after delivery of congenitally infected and normal infants. *J. Infect. Dis.* *146*, 1–6.
- Pereyra, F., and Rubin, R.H. (2004). Prevention and treatment of cytomegalovirus infection in solid organ transplant recipients. *Curr. Opin. Infect. Dis.* *17*, 357–361.
- Pevarello, P., Brasca, M.G., Amici, R., Orsini, P., Traquandi, G., Corti, L., Piutti, C., Sansonna, P., Villa, M., Pierce, B.S., et al. (2004). 3-Aminopyrazole inhibitors of CDK2/cyclin A as antitumor agents. 1. Lead finding. *J. Med. Chem.* *47*, 3367–3380.
- Quashie, P.K., Mesplède, T., Han, Y.-S., Oliveira, M., Singhroy, D.N., Fujiwara, T., Underwood,

- M.R., and Wainberg, M.A. (2012). Characterization of the R263K mutation in HIV-1 integrase that confers low-level resistance to the second-generation integrase strand transfer inhibitor dolutegravir. *J. Virol.* *86*, 2696–2705.
- Rimmert, B., Sabet, S., Ackad, E., and Yousef, M.S. (2014). A 3D structural model and dynamics of hepatitis C virus NS3/4A protease (genotype 4a, strain ED43) suggest conformational instability of the catalytic triad: implications in catalysis and drug resistivity. *J. Biomol. Struct. Dyn.* *32*, 950–958.
- Romaker, D., Schregel, V., Maurer, K., Auerochs, S., Marzi, A., Sticht, H., and Marschall, M. (2006). Analysis of the structure-activity relationship of four herpesviral UL97 subfamily protein kinases reveals partial but not full functional conservation. *J. Med. Chem.* *49*, 7044–7053.
- Rubin, R.H. (2000). Prevention of cytomegalovirus infection in organ transplant recipients. *Transpl. Infect. Dis. Off. J. Transplant. Soc.* *2*, 99–100.
- Saraste, M., Sibbald, P.R., and Wittinghofer, A. (1990). The P-loop--a common motif in ATP- and GTP-binding proteins. *Trends Biochem. Sci.* *15*, 430–434.
- Savva, C.G.W., Holzenburg, A., and Bogner, E. (2004). Insights into the structure of human cytomegalovirus large terminase subunit pUL56. *FEBS Lett.* *563*, 135–140.
- Scheffczik, H., Savva, C.G.W., Holzenburg, A., Kolesnikova, L., and Bogner, E. (2002). The terminase subunits pUL56 and pUL89 of human cytomegalovirus are DNA-metabolizing proteins with toroidal structure. *Nucleic Acids Res.* *30*, 1695–1703.
- Schleiss, M. (2005). Progress in cytomegalovirus vaccine development. *Herpes J. IHMF* *12*, 66–75.
- Schleiss, M.R. (2016). Cytomegalovirus vaccines under clinical development. *J. Virus Erad.* *2*, 198–207.
- Sinclair, J. (2008). Human cytomegalovirus: Latency and reactivation in the myeloid lineage. *J. Clin. Virol. Off. Publ. Pan Am. Soc. Clin. Virol.* *41*, 180–185.
- Sinclair, J., and Sissons, P. (2006). Latency and reactivation of human cytomegalovirus. *J. Gen. Virol.* *87*, 1763–1779.
- Sinzger, C., Grefte, A., Plachter, B., Gouw, A.S., The, T.H., and 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 (Pt 4), 741–750.

Smith, R.F., and Smith, T.F. (1989). Identification of new protein kinase-related genes in three herpesviruses, herpes simplex virus, varicella-zoster virus, and Epstein-Barr virus. *J. Virol.* 63, 450–455.

Söderberg-Nauclér, C., Fish, K.N., and Nelson, J.A. (1997). Reactivation of latent human cytomegalovirus by allogeneic stimulation of blood cells from healthy donors. *Cell* 91, 119–126.

Stern, H. (1984). Live cytomegalovirus vaccination of healthy volunteers: eight-year follow-up studies. *Birth Defects Orig. Artic. Ser.* 20, 263–269.

Stoelben, S., Arns, W., Renders, L., Hummel, J., Mühlfeld, A., Stangl, M., Fischereeder, M., Gwinner, W., Suwelack, B., Witzke, O., et al. (2014). Preemptive treatment of Cytomegalovirus infection in kidney transplant recipients with letermovir: results of a Phase 2a study. *Transpl. Int. Off. J. Eur. Soc. Organ Transplant.* 27, 77–86.

Story, R.M., and Steitz, T.A. (1992). Structure of the recA protein-ADP complex. *Nature* 355, 374–376.

Sudarsanam, T.D., Sahni, R.D., and John, G.T. (2006). Leflunomide: a possible alternative for gangciclovir sensitive and resistant cytomegalovirus infections. *Postgrad. Med. J.* 82, 313–314.

Tandon, R., Mocarski, E.S., and Conway, J.F. (2015). The A, B, Cs of herpesvirus capsids. *Viruses* 7, 899–914.

Tenney, D.J., Hurlburt, W.W., Micheletti, P.A., Bifano, M., and Hamatake, R.K. (1994). The UL8 component of the herpes simplex virus helicase-primase complex stimulates primer synthesis by a subassembly of the UL5 and UL52 components. *J. Biol. Chem.* 269, 5030–5035.

Thoma, C., Borst, E., Messerle, M., Rieger, M., Hwang, J.-S., and Bogner, E. (2006). Identification of the interaction domain of the small terminase subunit pUL89 with the large subunit pUL56 of human cytomegalovirus. *Biochemistry (Mosc.)* 45, 8855–8863.

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

benzimidazoles. *J. Med. Chem.* **38**, 4098–4105.

Vial, R., Zandotti, C., Alain, S., Decourt, A., Jourde-Chiche, N., Purgus, R., Bornet, C., Daniel, L., Moal, V., and Legris, T. (2017). Brincidofovir Use after Foscarnet Crystal Nephropathy in a Kidney Transplant Recipient with Multiresistant Cytomegalovirus Infection. *Case Rep. Transplant.* **2017**, 3624146.

Wald, A., Corey, L., Timmler, B., Magaret, A., Warren, T., Tyring, S., Johnston, C., Kriesel, J., Fife, K., Galitz, L., et al. (2014). Helicase-primase inhibitor pritelivir for HSV-2 infection. *N. Engl. J. Med.* **370**, 201–210.

Waldman, W.J., Knight, D.A., Lurain, N.S., Miller, D.M., Sedmak, D.D., Williams, J.W., and Chong, A.S. (1999a). Novel mechanism of inhibition of cytomegalovirus by the experimental immunosuppressive agent leflunomide. *Transplantation* **68**, 814–825.

Waldman, W.J., Knight, D.A., Blinder, L., Shen, J., Lurain, N.S., Miller, D.M., Sedmak, D.D., Williams, J.W., and Chong, A.S. (1999b). Inhibition of cytomegalovirus in vitro and in vivo by the experimental immunosuppressive agent leflunomide. *Intervirology* **42**, 412–418.

Walker, J.E., Saraste, M., Runswick, M.J., and Gay, N.J. (1982). Distantly related sequences in the alpha- and beta-subunits of ATP synthase, myosin, kinases and other ATP-requiring enzymes and a common nucleotide binding fold. *EMBO J.* **1**, 945–951.

Wang, J.B., Zhu, Y., McVoy, M.A., and Parris, D.S. (2012). Changes in subcellular localization reveal interactions between human cytomegalovirus terminase subunits. *Virol. J.* **9**, 315.

Weller, S.K., and Kuchta, R.D. (2013). The DNA helicase-primase complex as a target for herpes viral infection. *Expert Opin. Ther. Targets* **17**, 1119–1132.

Williams, S.L., Hartline, C.B., Kushner, N.L., Harden, E.A., Bidanset, D.J., Drach, J.C., Townsend, L.B., Underwood, M.R., Biron, K.K., and Kern, E.R. (2003). In vitro activities of benzimidazole D- and L-ribonucleosides against herpesviruses. *Antimicrob. Agents Chemother.* **47**, 2186–2192.

Wolf, D.G., Shimoni, A., Resnick, I.B., Stamminger, T., Neumann, A.U., Chou, S., Efferth, T., Caplan, O., Rose, J., Nagler, A., et al. (2011). Human cytomegalovirus kinetics following institution of artesunate after hematopoietic stem cell transplantation. *Antiviral Res.* **90**, 183–186.

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

Ye, L.B., and Huang, E.S. (1993). In vitro expression of the human cytomegalovirus DNA polymerase gene: effects of sequence alterations on enzyme activity. *J. Virol.* 67, 6339–6347.

Zahn, K.E., Tchesnokov, E.P., Götte, M., and Doublié, S. (2011). Phosphonoformic acid inhibits viral replication by trapping the closed form of the DNA polymerase. *J. Biol. Chem.* 286, 25246–25255.

Zhu, L.A., and Weller, S.K. (1992). The six conserved helicase motifs of the UL5 gene product, a component of the herpes simplex virus type 1 helicase-primase, are essential for its function. *J. Virol.* 66, 469–479.

Zhu, L., and Weller, S.K. (1988). UL5, a protein required for HSV DNA synthesis: genetic analysis, overexpression in *Escherichia coli*, and generation of polyclonal antibodies. *Virology* 166, 366–378.

Zvelebil, M.J., Barton, G.J., Taylor, W.R., and Sternberg, M.J. (1987). Prediction of protein secondary structure and active sites using the alignment of homologous sequences. *J. Mol. Biol.* 195, 957–961.

ANNEXES

Données supplémentaires Article n°1**« Contrasting effect of new HCMV pUL54 mutations on antiviral drug susceptibility: Benefits and limits of 3D analysis »**

Table S1: List of aliphatic->aliphatic mutant described in literature. Aliphatic residues can be A, V, I or L. NF: not found (never described in the literature). ^a: ratio: IC50 of mutant/IC50 of wild type found in the literature. ^b: mutations characterized as sensitive in the literature, data not available.

WT	mutant	locus	Ratio ^a			protein domain	Reference	
			GCV	CDV	FOS			
A	V	809	2.6	1.7	6.3	Fingers	Chou., 2011	
	L	NF			-	-	-	
	I	NF			-	-	-	
V	A	355	S ^b	S ^b	S ^b	3'-5' Exonuclease	Chou et al., 1999	
		377	S ^b	S ^b	S ^b	3'-5' Exonuclease	Chou et al., 2010	
		544	1	1.1	0.9	3'-5' Exonuclease	Chou., 2011	
		787	4.7	0.7	3.2	Fingers	present paper	
		953	S ^b	S ^b	S ^b	Palm	Chou et al., 1999	
	L	L	787	2.4	1	4.1	Fingers	Weinberg et al., 2003
			812	2.5	3.2	2.9	Fingers	Cihlar et al., 1998
			873	S ^b	S ^b	S ^b	Palm	Chou et al., 1999
			946	S ^b	S ^b	S ^b	Palm	Gilbert et al., 2011
		I	694	S ^b	S ^b	S ^b	Palm	Chou et al., 2010
781	1-4	1.2	4-5.2	Fingers	Cihlar et al., 1998, Chou et al., 2011			
L	A	NF			-	-	-	
	V	773	3	2.5	4.4	Fingers	Mousavi et al., 2003	
		802	S ^b	S ^b	S ^b	Fingers	Gilbert et al., 2011, Gilbert and Boivin, 2005	
		926	S ^b	S ^b	S ^b	Palm	Gilbert and Boivin, 2005	
	I	501	6	9	1.4	3'-5' Exonuclease	Cihlar et al., 1998	
		1020	S ^b	S ^b	S ^b	Thumb	Chou et al., 1999	
I	A	NF			-	-	-	
	V	837	S ^b	S ^b	S ^b	Palm	Chou et al., 2010	
	L	NF			-	-	-	

REFERENCES

- Boivin G., Goyette N., Farhan M., Ives J. and Elston R., Incidence of cytomegalovirus UL97 and UL54 amino acid substitutions detected after 100 or 200 days of valganciclovir prophylaxis. *J. Clin. Virol.* 53, 2012, 208–213.
- Chevillotte M., Ersing I., Mertens T. and von Einem J., Differentiation between polymorphisms and resistance-associated mutations in human cytomegalovirus DNA polymerase, *Antimicrob. Agents Chemother.* 54, 2010, 5004–5011.
- Chou S., Phenotypic diversity of cytomegalovirus DNA polymerase gene variants observed after antiviral therapy, *J. Clin. Virol.* 50 (4), 2011, 287–291.
- Chou S., Marousek G., Guentzel S., Follansbee S.E., Poscher M.E., Lalezari J.P., Miner R.C. and Drew W.L., Evolution of mutations conferring multidrug resistance during prophylaxis and therapy for cytomegalovirus disease, *J. Infect. Dis.* 176, 1997, 786–789.
- Chou S., Marousek G., Li S. and Weinberg A., Contrasting drug resistance phenotypes resulting from cytomegalovirus DNA polymerase mutations at the same exonuclease locus, *J. Clin. Virol.* 43, 2008, 107–109.
- Chou S., Marousek G., Boivin G., Goyette N., Farhan M., Ives J.A. and Elston R., Recombinant phenotyping of cytomegalovirus sequence variants detected after 200 or 100 days of valganciclovir prophylaxis, *Transplantation* 90 (12), 2010, 1409–1413.
- Chou S., Marousek G. and Bowlin T.L., Cyclopropavir susceptibility of cytomegalovirus DNA polymerase mutants selected after antiviral drug exposure, *Antimicrob. Agents Chemother.* 56 (1), 2011, 197–201.
- Eckle T., Prix L., Jahn G., Klingebiel T., Handgretinger R., Selle B. and Hamprecht K., Drug-resistant human cytomegalovirus infection in children after allogeneic stem cell transplantation may have different clinical outcomes, *Blood* 96, 2000, 3286–3289.
- Lurain N.S. and Chou S., Antiviral drug resistance of human cytomegalovirus, *Clin. Microbiol. Rev.* 23 (4), 2010, 689–712.
- Mousavi-Jazi M., Schloss L., Wahren B. and Brytting M., Point mutations induced by foscarnet (PFA) in the human cytomegalovirus DNA polymerase, *J. Clin. Virol.* 26 (3), 2003, 301–306.

Table S2: Sequences of *UL54*-primers used for mutagenesis-PCR.

Mutation	Primer Direction	Primer sequence
<i>UL54</i> D515Y	Forward	CAACACTATGGCCGAGCTTTACCTGCGGCAACGCAAGGATTACCTGTCTTACAAGGACATCCCTAGGGATA ACAGGTAATCGATTT
	Reverse	CATTAGCCACGAAACAACGCGGGATGTCCTTGTAAAGACAGGTAATCCTTGCGTTGCCGAGGTGCCAGTGT TACAACCAATTAACC
<i>UL54</i> V787A	Forward	CTCGGAACTGCTCAACAAGTGGGTTTCGACGCGGCGTGCCCGCAATGCATGCGCGAGTGTAGGGATAAC AGGGTAATCGATTT
	Reverse	TACGGCGCACAGGTCTTGACACTCGCGCATGCATTGCGGGCACGCCGCTGCGAAACCCGCCAGTGTAC AACCAATTAACC

METHODOLOGY FOR 3D MODELING

The pUL54 theoretical structure was built by homology modeling with standalone version of MODELLER 9.9 (Eswar et al., 2007). Sequence of pUL54 has been aligned with three templates.

As described elsewhere (Gilbert et al., 2011), we first used the residues 60-1197 of chain B of pUL52 from HSV1 (PDB 2GV9) which shares 62.78% of homology including 31.53% of identity with pUL54, and then is the closest homologue of pUL54 of known structure. pUL54 moieties aligned to non-resolved loops (i.e. fragments, 1-59, 640-700 and 1098-1135) of pUL52 were retrieved from sequence alignment for calculations including N-terminal.

Secondly, the X-ray structure of the own C-terminal part of pUL54 was taken from PDB 1YYP (i.e. complex of pUL44 with fragment 1223-1242 of pUL54).

Finally, a third template was used to mimic the conformation of pUL54 bounded to DNA in its 3'-5' exonuclease domain. To this end, we further aligned residues 296-554 of pUL54 with amino acids 109-342 of the DNA polymerase of Bacteriophage RB69 in editing mode (PDB 1CLQ). ClustalW (Thompson et al., 1994) analysis revealed a 53.64% homology including 19.92% of identity between the two aligned domains. Thanks to the versatility of the MODELLER software and especially the « *BLOCK* » option, we have been able to introduce metal ions and DNA duplex to take into account ions and DNA charges for side chains orientation. This last template was chosen to closer fit with the conformation of pUL54 during nicking process of mismatched bases or DNA incorporated drugs.

Refinement of the model was calculated in MODELLER with 300 iterations of conjugate gradients (VTFM protocol, variable target function method) followed by a fast refine level of molecular dynamics using simulated annealing (Sali and Blundell, 1993). Quality structures were assessed by calculating their Qmean score on dedicated web server (Benkert et al., 2009).

REFERENCES

- Benkert, P., Künzli, M., and Schwede, T. (2009). QMEAN server for protein model quality estimation. *Nucleic Acids Res.* 37, W510–W514.
- Eswar, N., Webb, B., Marti-Renom, M.A., Madhusudhan, M.S., Eramian, D., Shen, M.-Y., Pieper, U., and Sali, A. (2007). Comparative protein structure modeling using MODELLER. *Curr. Protoc. Protein Sci.* Editor. Board John E Coligan AI Chapter 2, Unit 2.9.
- Gilbert, C., Azzi, A., Goyette, N., Lin, S.-X., and Boivin, G. (2011). Recombinant phenotyping of cytomegalovirus UL54 mutations that emerged during cell passages in the presence of either ganciclovir or foscarnet. *Antimicrob. Agents Chemother.* 55, 4019–4027.
- Martin, M., Goyette, N., Ives, J., and Boivin, G. (2010). Incidence and characterization of cytomegalovirus resistance mutations among pediatric solid organ transplant patients who received valganciclovir prophylaxis. *J. Clin. Virol. Off. Publ. Pan Am. Soc. Clin. Virol.* 47, 321–324.
- Sali, A., and Blundell, T.L. (1993). Comparative protein modelling by satisfaction of spatial restraints. *J. Mol. Biol.* 234, 779–815.
- Thompson, J.D., Higgins, D.G., and Gibson, T.J. (1994). CLUSTAL W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice. *Nucleic Acids Res.* 22, 4673–4680.

Données supplémentaires**Amorces utilisées pour la production des BAC-CMVH portant des mutations sur UL54 ou UL97****Tableau S1 : Séquences des amorces UL54 utilisées pour la production des BAC CMVH**

Mutant BAC	Primer direction	Primer sequence
UL54 H686Y	Forward	CTCCGGCAGTAGTGGCGGCGTCGGCGTTTCCAACGACAATTACGGCGCCGGCGGTAAGTGGCTAGGGATAACAGGGTAATCGATTT
	Reverse	TGGCGCCTGTACGAAACCGCCGAGTACCGCCGGCGCCGTAATTGTCGTTGAAACGCCGAGCCAGTGTACAACCAATTAACC
UL54 G698V	Forward	CAATCACGGCGCCGGCGGTAAGTGGCGGTTTCTGACAGGTCGCCACGGTGTGAGCCGATAGGGATAACAGGGTAATCGATTT
	Reverse	GGTCGTTGTAGTAACCCACTCGGGCTCAAACACCGTGGCGACCTGGTACGAAACCGCCGAGCCAGTGTACAACCAATTAACC
UL54 N710K	Forward	CCAGGGCGCCACGGTGTGAGCCCGAGGTGGGTTACTACAAGACCCCGTGGCCGTGTTGATAGGGATAACAGGGTAATCGATTT
	Reverse	AAGGGTAGAGGCTGGCAAAGTCAACACCGCCACGGGGTCTTTGTAGTAACCCACTCGGGCTGCCAGTGTACAACCAATTAACC
UL54 I726T	Forward	CGTGGCCGTGTTGACTTTGCCAGCCTCTACCCTCCATCACCATGGCCACAACCTCTGCTATAGGGATAACAGGGTAATCGATTT
	Reverse	CCGGCACCAGCAGGGTGGAGTAGCAGAGGTTGTGGCCATGGTATGGAAGGGTAGAGGCTGGCCAGTGTACAACCAATTAACC
UL54 P747L	Forward	CTCCACCCTGCTGGTCCGGGTGGCGAGTACCCTGTGGACCTCGCCGACGTATACAGCGTCACTAGGGATAACAGGGTAATCGATTT
	Reverse	GGGTCACGCCGTTCTAGCGTGACGCTGTATACGTCGGCGAGGTCCACAGGGTACTCGCCACGCCAGTGTACAACCAATTAACC

Tableau S2 : Séquences des amorces *UL97* utilisées pour la production des BAC CMVH

Mutant BAC	Primer direction	Primer sequence
<i>UL97</i> F342Y	Forward	GGACATGAGCGACGAGAGCTACCGCCTGGGCCAGGGCTCCTACGGCGAGGTCTGGCCGCTCGATAGGGATA ACAGGGTAATCGATTT
	Reverse	CCTTGACCACGCGATAGCGATCGAGCGGCCAGACCTCGCCCTAGGAGCCCTGGCCCAGGGTGCAGTGTT ACAACCAATTAACC
<i>UL97</i> H393Y	Forward	CGAGCAACAGCAGCCGCGCTGCTGGTGGGCACGGCGTGTACCGCGGTCTGCTCACGGCCACTAGGGATAA CAGGGTAATCGATTT
	Reverse	TGTGCAGCAGACAGCAGCCCGTGGCCGTGAGCAGACCGCGGTACACGCCGTGCCACCAGCGGCCAGTGTT ACAACCAATTAACC

Données supplémentaires Article n°2**« Highlighting of a LAGLIDADG and a zing finger motifs located in the pUL56 sequence crucial for HCMV replication »****Table S1: Sequences used for alignment of pUL56 and homologues.**

Identification	Sequence identification	Accession number	Reference
HSV_1	Human herpesvirus type 1 pUL28 packaging protein	CAA32321	Dolan et al., 1992
HSV_2	Human herpesvirus type 2 pUL28 packaging protein	CAB0675	Barnett et al., 1992
CeHV_1	Cercopithecine herpesvirus 1 pUL28	BAC58068	Pelyrigina et al., 2003
CeHV_2	Cercopithecine herpesvirus 2 pUL28	AAU84532	Tyler, Peters, and Severini, 2005
EHV_1	Equine herpesvirus 1 ORF32	YP_053077	Telford et al., 1992
GaHV_3	Gallid herpesvirus 3 pUL28	BAB16538	Izumiya et al., 2001
MeHV_1	Meleagrid herpesvirus 1 pUL28 processing and transport protein	AAG30068	Kingham et al., 2001
HHV_3	Human herpesvirus 3 (Varicella-Zooster virus)	CAA27913	Davison and Scott, 1986
SUID	Suid herpesvirus 1 (Pseudorabies virus) UL28	YP_068331	Klupp et al., 2004
GaHV_1	Gallid herpesvirus 1 UL28-like protein	YP_182357	Thureen et al., 2006
GaHV_2	Gallid herpesvirus 2 Homologue of HSV 1 ICP 18.5 packaging protein	AAF66763	Kato et al., 1999
AD169	Human cytomegalovirus AD169 strain pUL56	X17403	Chee et al., 1990
HHV_6_B	Human herpesvirus 6 type B transport protein	Q9WT24	Isegawa et al., 1999
HHV_6_A_GS	Human herpesvirus 6 type A transport protein	AHK06969	None
CCMV	Chimpanzee herpesvirus pUL56	AAM00906	Davison et al., 2003
RhCMV	Cercopithecine herpesvirus 8 (Rhesus cytomegalovirus) putative pUL56 DNA packaging protein	AAZ80592	None
MCMV	Murid herpesvirus 1 (Murine cytomegalovirus) major DNA-binding protein	CAA47415	Messerle et al., 1992
RCMV	Murid herpesvirus 2 (Rat cytomegalovirus Maastricht) pR56 protein	AAC56431	Beuken et al., 1996
HHV_8	Human herpesvirus 8 BALF3 EBV homolog, transport protein homologue	AAC57084	Moore et al., 1996
HHV_4_1	Human herpesvirus 4 type 1 BALF3	YP_401715	de Jesus et al., 2003
HHV_4_2	Human herpesvirus 4 type 2 BALF3	YP001129509	Dolan A et al., 2006

Table S2: Sequences of *UL56*-primers used for mutagenesis-PCR into putative *LATLNDIERFL* pattern.

Mutant BAC	Primer direction	Primer sequence
<i>UL56</i> D139A	Forward	GGACAACGTCCGTTTCAGCGTCAGTCTGGCCACACTCAACGCCATCGAGCGCTTCTGTGCAATAGGGATAAC AGGGTAATCGATTT
	Reverse	TCCCGTACACGTAGTTCATTTTGCACAGGAAGCGCTCGATGGCGTTGAGTGTGGCCAGACTGAGCCAGTGTTA CAACCAATTAACC
<i>UL56</i> E141A	Forward	CGTCCGTTTCAGCGTCAGTCTGGCCACACTCAACGACATCGCCCGCTTCTGTGCAAAATGAATAGGGATAACA GGGTAATCGATTT
	Reverse	CCAGGATCCCGTACACGTAGTTCATTTTGCACAGGAAGCGGGCGATGTCGTTGAGTGTGGCCAGCCAGTGTTA CAACCAATTAACC
<i>UL56</i> L134A	Forward	GGAGCTCCAGTTTACGGACAACGTCCGTTTCAGCGTCAGTGCGGCCACACTCAACGACATCGATAGGGATAAC AGGGTAATCGATTT
	Reverse	TCATTTTGCACAGGAAGCGCTCGATGTCGTTGAGTGTGGCCGACTGACGCTGAAACGGACGTGCCAGTGTTA CAACCAATTAACC
<i>UL56</i> L137A	Forward	GTTTACGGACAACGTCCGTTTCAGCGTCAGTCTGGCCACAGCCAACGACATCGAGCGCTTCTTAGGGATAAC AGGGTAATCGATTT
	Reverse	ACACGTAGTTCATTTTGCACAGGAAGCGCTCGATGTCGTTGGCTGTGGCCAGACTGACGCTGAGCCAGTGTTA CAACCAATTAACC
<i>UL56</i> I140A	Forward	CAACGTCCGTTTCAGCGTCAGTCTGGCCACACTCAACGACGCCGAGCGCTTCTGTGCAAAATTAGGGATAAC AGGGTAATCGATTT
	Reverse	GGATCCCGTACACGTAGTTCATTTTGCACAGGAAGCGCTCGGCGTCTGTTGAGTGTGGCCAGACGCCAGTGTTA CAACCAATTAACC
<i>UL56</i> L144A	Forward	CAGCGTCAGTCTGGCCACACTCAACGACATCGAGCGCTTCGCGTGCAAAATGAACTACGTGTATAGGGATAAC AGGGTAATCGATTT
	Reverse	CCTCCGGCGCCAGGATCCCGTACACGTAGTTCATTTTGCACGCGAAGCGCTCGATGTCGTTGAGCCAGTGTTAC AACCAATTAACC
<i>UL56</i> L134A L137A I140A L144A	Forward	GGAGCTCCAGTTTACGGACAACGTCCGTTTCAGCGTCAGTGCGGCCACAGCCAACGACGCCGAGCGCTTCGCG TGCAAAATGAACTACGTGTATAGGGATAACAGGGTAATCGATTT
	Reverse	CCTCCGGCGCCAGGATCCCGTACACGTAGTTCATTTTGCACGCGAAGCGCTCGGCGTCTGTTGGCTGTGGCCG ACTGACGCTGAAACGGACGTGCCAGTGTTACAACCAATTAACC
<i>UL56</i> I140A L144A	Forward	CAACGTCCGTTTCAGCGTCAGTCTGGCCACACTCAACGACGCCGAGCGCTTCGCGTGCAAAATGAACTACGTG TATAGGGATAACAGGGTAATCGATTT
	Reverse	CCTCCGGCGCCAGGATCCCGTACACGTAGTTCATTTTGCACGCGAAGCGCTCGGCGTCTGTTGAGTGTGGCCAG ACGCCAGTGTTACAACCAATTAACC
<i>UL56</i> L134A L144A	Forward	GGAGCTCCAGTTTACGGACAACGTCCGTTTCAGCGTCAGTGCGGCCACACTCAACGACATCGAGCGCTTCGCG TGCAAAATGAACTACGTGTATAGGGATAACAGGGTAATCGATTT
	Reverse	CCTCCGGCGCCAGGATCCCGTACACGTAGTTCATTTTGCACGCGAAGCGCTCGATGTCGTTGAGTGTGGCCG ACTGACGCTGAAACGGACGTGCCAGTGTTACAACCAATTAACC

Table S3: Sequences of *UL56*-primers used for mutagenesis-PCR into putative zinc-finger pattern.

Mutant BAC	Primer direction	Primer sequence
<i>UL56</i> C191S	Forward	GCCGGTGGCGCTCAGGAAGTGTACGTGCGAAGGGACGACATCTGCCAATGCTACGAGGAGCTT AGGGATAACAGGGTAATCGATT
	Reverse	CCTGATTCGGGATGATGGTCAGCTCCTCGTAGCATTGGGCAGATGTCGTCCCTTCGACGTACAGC CAGTGTACAAACCAATTAACC
<i>UL56</i> C194S	Forward	GCGTCAGGAAGTGTACGTGCGAAGGGACGACATGCGCCAATCTTACGAGGAGCTGACCATCATT AGGGATAACAGGGTAATCGATT
	Reverse	GCGAGCGGCCCTGATTCGGGATGATGGTCAGCTCCTCGTAAGATTGGGCGCATGTCGTCCCTTGC CAGTGTACAAACCAATTAACC
<i>UL56</i> C217S	Forward	TCAGGGCCGCTCGCTGAACAAGCGGCTGCAGGGCTTGTGTCTAACCATATAGCGGTCCACCGTA GGGATAACAGGGTAATCGATT
	Reverse	CATCGGACTGGCTTGACGGACGGTGACCCTATATGGTTAGACAGCAAGCCCTGCAGCCGCTG CCAGTGTACAAACCAATTAACC
<i>UL56</i> N203A	Forward	GACATGCGCCAATGCTACGAGGAGCTGACCATCATCCCGCTCAGGGCCGCTCGCTGAACAATA GGGATAACAGGGTAATCGATT
	Reverse	ACAGCAAGCCCTGCAGCCGCTTGTTCAGCGAGCGGCCCTGAGCCGGGATGATGGTCAGCTCCTGC CAGTGTACAAACCAATTAACC
<i>UL56</i> Q204R	Forward	ATGCGCCAATGCTACGAGGAGCTGACCATCATCCGAATAGAGCCGCTCGCTGAACAAGCGTA GGGATAACAGGGTAATCGATT
	Reverse	TGCACAGCAAGCCCTGCAGCCGCTTGTTCAGCGAGCGGCCCTTATTCGGGATGATGGTCAGCTGC CAGTGTACAAACCAATTAACC
<i>UL56</i> G205A	Forward	CGCCCAATGCTACGAGGAGCTGACCATCATCCGAATCAGGCCCGCTCGCTGAACAAGCGGCTTA GGGATAACAGGGTAATCGATT
	Reverse	GGTTGCACAGCAAGCCCTGCAGCCGCTTGTTCAGCGAGCGGCCCTGATTCGGGATGATGGTCAG CCAGTGTACAAACCAATTAACC
<i>UL56</i> H219A	Forward	CCGCTCGCTGAACAAGCGGCTGCAGGGCTTGTGTGCAACGCTATAGCGGTCCACCGTCCGTCTA GGGATAACAGGGTAATCGATT
	Reverse	TATTCACATCGGACTGGCTTGACGGACGGTGGACCCTATAGCGTTGCACAGCAAGCCCTGCAGC CAGTGTACAAACCAATTAACC
<i>UL56</i> H223A	Forward	CAAGCGGCTGCAGGGCTTGTGTGCAACCATATAGCGGTGCCCCGTCCGTCAAGCCAGTCCGATA GGGATAACAGGGTAATCGATT
	Reverse	CCACCGTCTGGATATTCACATCGGACTGGCTTGACGGACGGGCGACCCTATATGTTGCACAGC CAGTGTACAAACCAATTAACC

Données supplémentaires Article n°3**« Identification of a short sequence in the HCMV terminase pUL56 essential for interaction with pUL89 subunit »****Table S1: Sequences used for alignment of pUL56 and homologues.**

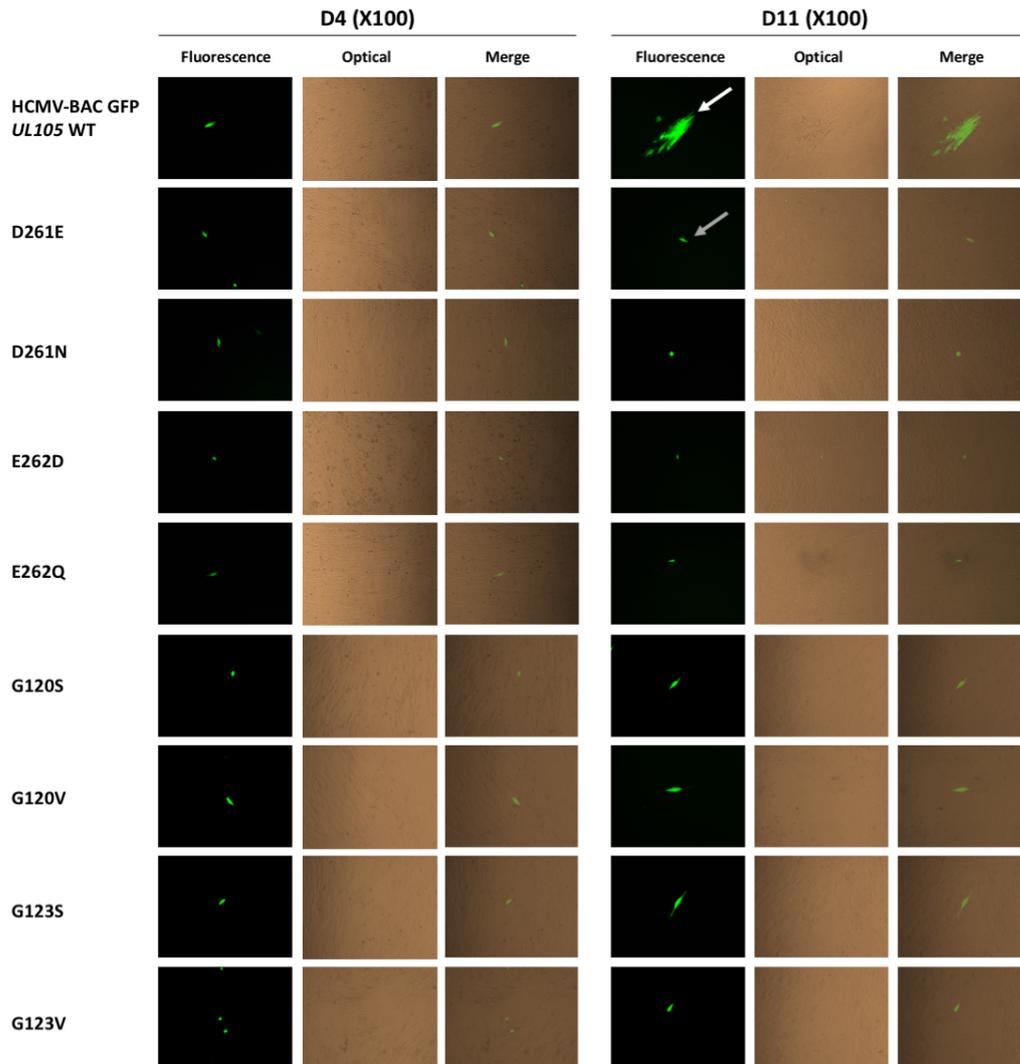
Identification	Sequence identification	Accession number	Reference
HSV_1	Human herpesvirus type 1 pUL28 packaging protein	CAA32321	Dolan et al., 1992
HSV_2	Human herpesvirus type 2 pUL28 packaging protein	CAB0675	Barnett et al., 1992
CeHV_1	Cercopithecine herpesvirus 1 pUL28	BAC58068	Pelyrigina et al., 2003
CeHV_2	Cercopithecine herpesvirus 2 pUL28	AAU84532	Tyler, Peters, and Severini, 2005
EHV_1	Equine herpesvirus 1 ORF32	YP_053077	Telford et al., 1992
GaHV_3	Gallid herpesvirus 3 pUL28	BAB16538	Izumiya et al., 2001
MeHV_1	Meleagrid herpesvirus 1 pUL28 processing and transport protein	AAG30068	Kingham et al., 2001
HHV_3	Human herpesvirus 3 (Varicella-Zooster virus)	CAA27913	Davison and Scott, 1986
SUID	Suid herpesvirus 1 (Pseudorabies virus) UL28	YP_068331	Klupp et al., 2004
GaHV_1	Gallid herpesvirus 1 UL28-like protein	YP_182357	Thureen et al., 2006
GaHV_2	Gallid herpesvirus 2 Homologue of HSV 1 ICP 18.5 packaging protein	AAF66763	Kato et al., 1999
AD169	Human cytomegalovirus AD169 strain pUL56	X17403	Chee et al., 1990
HHV_6_B	Human herpesvirus 6 type B transport protein	Q9WT24	Isegawa et al., 1999
HHV_6_A_GS	Human herpesvirus 6 type A transport protein	AHK06969	None
CCMV	Chimpanzee herpesvirus pUL56	AAM00906	Davison et al., 2003
RhCMV	Cercopithecine herpesvirus 8 (Rhesus cytomegalovirus) putative pUL56 DNA packaging protein	AAZ80592	None
MCMV	Murid herpesvirus 1 (Murine cytomegalovirus) major DNA-binding protein	CAA47415	Messerle et al., 1992
RCMV	Murid herpesvirus 2 (Rat cytomegalovirus Maastricht) pR56 protein	AAC56431	Beuken et al., 1996
HHV_8	Human herpesvirus 8 BALF3 EBV homolog, transport protein homologue	AAC57084	Moore et al., 1996
HHV_4_1	Human herpesvirus 4 type 1 BALF3	YP_401715	de Jesus et al., 2003
HHV_4_2	Human herpesvirus 4 type 2 BALF3	YP001129509	Dolan A et al., 2006

Table S2: Sequences of *UL56*-primers used for deletion or combinations of mutations.

Mutant BAC	Primer direction	Primer sequence
<i>UL56</i> Del W671 - F680	Forward	TTTGGTCAAATGCGCGGAAGGTACCGTGTATCCCAGTGAGAATTTTTCGGACTGTCAGGATAGGG ATAACAGGGTAATCGATTT
	Reverse	CCTTCTGCAGCACGTTTAGGTCCTGACAGTCCGAAAAATTCTCACTGGGATACACGGTACGCCAGT GTTACAACCAATTAACC
<i>UL56</i> W671A Y676A F679A F680A	Forward	TTTGGTCAAATGCGCGGAAGGTACCGTGTATCCCAGTGAGGCGATGGTGGTGAAGGCTATGGGT GCTGCCAATTTTTCGGACTGTCAGGATAGGGATAACAGGGTAATCGATTT
	Reverse	CCTTCTGCAGCACGTTTAGGTCCTGACAGTCCGAAAAATTGGCAGCACCCATAGCCTTCACCACCA TCGCCTCACTGGGATACACGGTACGCCAGTGTACAACCAATTAACC
<i>UL56</i> W671A	Forward	TTGGTCAAATGCGCGGAAGGTACCGTGTATCCCAGTGAGGCGATGGTGGTGAAGTATATGGGTA GGGATAACAGGGTAATCGATTT
	Reverse	AGTCCGAAAAATTGAAAAAACCATATACTTCACCACCATGGCCTCACTGGGATACACGGTACGC CAGTGTACAACCAATTAACC
<i>UL56</i> Y676A	Forward	GGAAGGTACCGTGTATCCCAGTGAGTGGATGGTGGTGAAGGCTATGGGTTTTTCAATTTTTCTA GGGATAACAGGGTAATCGATTT
	Reverse	CGTTTAGGTCCTGACAGTCCGAAAAATTGAAAAAACCATAGCCTTCACCACCATCCACTCACGCC AGTGTACAACCAATTAACC
<i>UL56</i> F679A	Forward	CGTGTATCCCAGTGAGTGGATGGTGGTGAAGTATATGGGTGCTTCAATTTTTCGGACTGTCATA GGGATAACAGGGTAATCGATTT
	Reverse	TCTGCAGCACGTTTAGGTCCTGACAGTCCGAAAAATTGAAAGCACCCATATACTTCACCACCAGCC AGTGTACAACCAATTAACC
<i>UL56</i> F680A	Forward	GTATCCCAGTGAGTGGATGGTGGTGAAGTATATGGGTTTTGCCAATTTTTCGGACTGTCAGGATA GGGATAACAGGGTAATCGATTT
	Reverse	CCTTCTGCAGCACGTTTAGGTCCTGACAGTCCGAAAAATTGGCAAAACCCATATACTTCACCAGCC AGTGTACAACCAATTAACC

Données supplémentaires Article n°4

« **Highlighting an ATP-binding site in helicase pUL105 and a zing-finger pattern in primase pUL70 crucial for HCMV replication** »



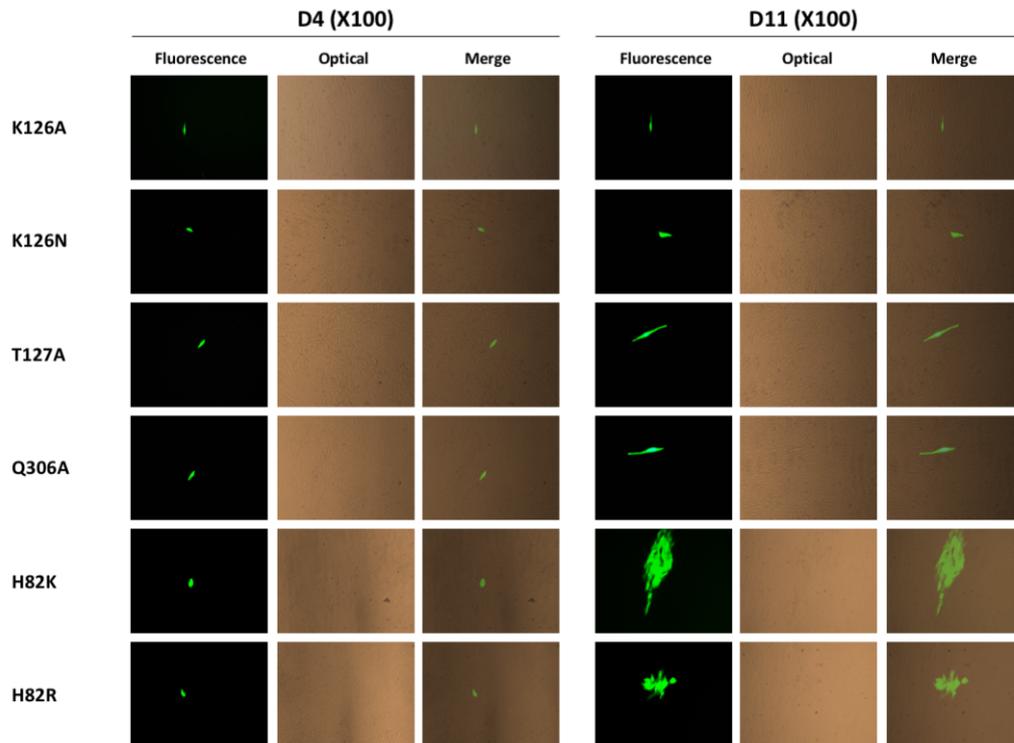


Figure S1: Plaque formation assay in MRC-5 cells after transfection of HCMV-BAC GFP *UL105* WT (AD169) or recombinant virus strains with a single mutation. Green fluorescent foci (white arrow) were observed with the wild-type HCMV-BAC GFP and single infected cells (grey arrow) were observed with the other recombinants viruses. Eleven days after transfection of human fibroblasts, we observed cytopathic effect only for H82K and H82R mutations. Other mutations dramatically impaired viral replication and propagation in cell-culture.

Table S1: Sequences used for alignment of pUL105 and homologues.

Identification	Sequence identification	Accession number	Reference
HSV_1	Human herpesvirus type 1	AAA45819	McGeoch et al., 1988
HSV_2	Human herpesvirus type 2	AKN90872	Collot et al., 2016
CeHV_1	Cercopithecine herpesvirus 1	NP_851864	Pelyrigina et al., 2003
CeHV_2	Cercopithecine herpesvirus 2	YP_164447	Tyler, Peters, and Severini, 2005
EHV_1	Equine herpesvirus 1	YP_053101	Telford et al., 1992
GaHV_3	Gallid herpesvirus 3	NP_066835	Izumiya et al., 2001
MeHV_1	Meleagrid herpesvirus 1	NP_073298	Afonso et al., 2001
HHV_3	Human herpesvirus 3 (Varicella-Zooster virus)	AFO85632	Peters et al., 2012
SUID	Suid herpesvirus 1 (Pseudorabies virus)	AAA50986	Dean et al., 1994
GaHV_1	Gallid herpesvirus 1	AER28164	Thureen et al., 2006
GaHV_2	Gallid herpesvirus 2	YP_001033933	Tulman et al., 2000
AD169	Human cytomegalovirus AD169 strain pUL105	P16736	Chee et al., 1990
RhCMV	Cercopithecine herpesvirus 8 (Rhesus cytomegalovirus)	AAZ80648	Rivailler et al., 2006
MCMV	Murid herpesvirus 1 (Murine cytomegalovirus)	CAJ86580	Sweet et al., 2007
RCMV	Murid herpesvirus 2 (Rat cytomegalovirus Maastricht)	AAF99194	Vink et al., 2000
HHV_8	Human herpesvirus 8	YP_001129396	Rezaee et al., 2006
HHV_4_1	Human herpesvirus 4 type 1	AGZ95191	Tsai et al., 2013
HHV_4_2	Human herpesvirus 4 type 2	YP_001129475	Dolan A et al., 2006

Table S2: Sequences used for alignment of pUL70 and homologues.

Identification	Sequence identification	Accession number	Reference
HSV_1	Human herpesvirus type 1	AFE62881	Macdonald et al., 2012
HSV_2	Human herpesvirus type 2	AEV91392	NA
CeHV_1	Cercopithecine herpesvirus 1	NP_851913	Pelyrigina et al., 2003
CeHV_2	Cercopithecine herpesvirus 2	YP_164496	Tyler, Peters, and Severini, 2005
EHV_1	Equine herpesvirus 1	AII81101	NA
GaHV_3	Gallid herpesvirus 3	NP_066885	Izumiya et al., 2001
MeHV_1	Meleagrid herpesvirus 1	NP_073347	Afonso et al., 2001
HHV_3	Human herpesvirus 3 (Varicella-Zoster virus)	AFO85582	Peters et al., 2012
SUID	Suid herpesvirus 1 (Pseudorabies virus)	AJD79487	NA
GaHV_1	Gallid herpesvirus 1	AER28112	Lee et al., 2011
GaHV_2	Gallid herpesvirus 2	YP_001033982	Tulman et al., 2000
AD169	Human cytomegalovirus AD169 strain pUL70	ACL51139	Bradley et al., 2009
RhCMV	Cercopithecine herpesvirus 8 (Rhesus cytomegalovirus)	AAZ80600	Rivailler et al., 2006
MCMV	Murid herpesvirus 1 (Murine cytomegalovirus)	CCE57397	Smith et al., 2013
RCMV	Murid herpesvirus 2 (Rat cytomegalovirus Maastricht)	AAF99156	Vink et al., 2000
HHV_8	Human herpesvirus 8	ABD28907	Rezaee et al., 2006
HHV_4_1	Human herpesvirus 4 type 1	CEQ37212	NA
HHV_4_2	Human herpesvirus 4 type 2	YP_001129457	Dolan et al., 2006

Table S3: Sequences of *UL105*-primers used for mutagenesis-PCR into Walker A motif.

Mutant BAC	Primer direction	Primer sequence
<i>UL105</i> G120S	Forward	CCGTTGGCCCTTCTTTCCCTCCGCGCGTCTCGTCACCAGCACGGCGGGCCGGCAAGACTA GGGATAACAGGGTAATCGATT
	Reverse	CCAGCACCTGGATGCTGGAAGTCTTGCCGGCGCCCGCCGTGCTGGTGACGAGCAGCGCGGGAG CCAGTGTACAACCAATTAACC
<i>UL105</i> G120V	Forward	CCGTTGGCCCTTCTTTCCCTCCGCGCGTCTCGTCACCCTCACGGCGGGCCGGCAAGACTAG GGATAACAGGGTAATCGATT
	Reverse	CCAGCACCTGGATGCTGGAAGTCTTGCCGGCGCCCGCCGTGACGGTGACGAGCAGCGCGGGAG CCAGTGTACAACCAATTAACC
<i>UL105</i> G123S	Forward	CTTCTTTCCCTCCGCGCGTCTCGTCACCGGCACGGCGAGCGCCGGCAAGACTTCCAGCATTAG GGATAACAGGGTAATCGATT
	Reverse	GATTGGCCGCCAGCACCTGGATGCTGGAAGTCTTGCCGGCGCTCGCCGTGCCGGTGACGAGCAG CCAGTGTACAACCAATTAACC
<i>UL105</i> G123V	Forward	CTTCTTTCCCTCCGCGCGTCTCGTCACCGGCACGGCGGTGCGCCGGCAAGACTTCCAGCATTAG GGATAACAGGGTAATCGATT
	Reverse	GATTGGCCGCCAGCACCTGGATGCTGGAAGTCTTGCCGGCGACCGCCGTGCCGGTGACGAGCAG CCAGTGTACAACCAATTAACC
<i>UL105</i> K126A	Forward	CTTCCGCGCGTCTCGTCACCGGCACGGCGGGCGCCGGCGGCACTTCCAGCATCCAGGTGCTTA GGGATAACAGGGTAATCGATT
	Reverse	CGCAATCTAGATTGGCCGCCAGCACCTGGATGCTGGAAGTCGCGCCGGCGCCCGTGCCTGGG CCAGTGTACAACCAATTAACC
<i>UL105</i> K126N	Forward	CTTCCGCGCGTCTCGTCACCGGCACGGCGGGCGCCGGCAACTTCCAGCATCCAGGTGCTTA GGGATAACAGGGTAATCGATT
	Reverse	CGCAATCTAGATTGGCCGCCAGCACCTGGATGCTGGAAGTGTGCGGGCGCCCGTGCCTGGG CCAGTGTACAACCAATTAACC
<i>UL105</i> T127A	Forward	CCGCGCGTCTCGTCACCGGCACGGCGGGCGCCGGCAAGCTTCCAGCATCCAGGTGCTGGCT AGGGATAACAGGGTAATCGATT
	Reverse	TCACGCAATCTAGATTGGCCGCCAGCACCTGGATGCTGGAAGCTTGCCGGCGCCCGTGCCTGGC CAGTGTACAACCAATTAACC

Table S4: Sequences of *UL105*-primers used for mutagenesis-PCR into Walker B motif.

Mutant BAC	Primer direction	Primer sequence
<i>UL105</i> D261E	Forward	GGACCTCTCGGAGCTGTGCGAGAGCAATATCATCGTCATCGAGGAGTGCGGCCTTATGCTGCGTAGGGATAACAGGGTAATCGATTT
	Reverse	CCACCACCTGCAGCATGTAGCGCAGCATAAGGCCGCACTCCTCGATGACGATGATATTGCTCTGCCAGTGTTACAACCAATTAACC
<i>UL105</i> D261N	Forward	GGACCTCTCGGAGCTGTGCGAGAGCAATATCATCGTCATCAACGAGTGCGGCCTTATGCTGCGTAGGGATAACAGGGTAATCGATTT
	Reverse	CCACCACCTGCAGCATGTAGCGCAGCATAAGGCCGCACTCGTTGATGACGATGATATTGCTCTGCCAGTGTTACAACCAATTAACC
<i>UL105</i> E262D	Forward	CCTCTCGGAGCTGTGCGAGAGCAATATCATCGTCATCGACGACTGCGGCCTTATGCTGCGCTATAGGGATAACAGGGTAATCGATTT
	Reverse	ACACCACCACCTGCAGCATGTAGCGCAGCATAAGGCCGCACTCGTCGATGACGATGATATTGCGCCAGTGTTACAACCAATTAACC
<i>UL105</i> E262Q	Forward	CCTCTCGGAGCTGTGCGAGAGCAATATCATCGTCATCGACCAGTGCGGCCTTATGCTGCGCTATAGGGATAACAGGGTAATCGATTT
	Reverse	ACACCACCACCTGCAGCATGTAGCGCAGCATAAGGCCGCACTGGTCGATGACGATGATATTGCGCCAGTGTTACAACCAATTAACC

Table S5: Sequences of *UL105*-primers used for mutagenesis-PCR into motif III.

Mutant BAC	Primer direction	Primer sequence
<i>UL105</i> Q306A	Forward	ACGCCGCGTGCCCTGCATCATCTGCGTCGGTTCGCCACGGCGACCGAGGCGCTGGAGAGCCGTAGGGATAA CAGGGTAATCGATT
	Reverse	TTTGCGTGTAGTGGTCGTAGCGGCTCTCCAGCGCCTCGGTCGCCGTGGGCGAACCGACGCAGAGCCAGTGTT ACAACCAATTAACC

Table S6: Sequences of *UL105*-primers used for mutagenesis-PCR of H82.

Mutant BAC	Primer direction	Primer sequence
<i>UL105</i> H82K	Forward	CCCCTCTGCCGCAACTACCGCCGCGGCAACGACGACCGTTAAATCCTCCGCCTCCTTCTGCTAGGGATAACA GGTAATCGATT
	Reverse	CGGACGAAGCGGCAGCGGCGGCAGAAGAGGAGGCGGAGGATTTAACGGTCGTCGTTGCCGCGGGCCAGTG TTACAACCAATTAACC
<i>UL105</i> H82R	Forward	CCCCTCTGCCGCAACTACCGCCGCGGCAACGACGACCGTTCGCTCCTCCGCCTCCTTCTGCTAGGGATAACA GGTAATCGATT
	Reverse	CGGACGAAGCGGCAGCGGCGGCAGAAGAGGAGGCGGAGGAGCGAACGGTCGTCGTTGCCGCGGGCCAGTG TTACAACCAATTAACC

Table S7: Sequences of *UL70*-primers used for mutagenesis-PCR into putative zinc-finger pattern.

Mutant BAC	Primer direction	Primer sequence
<i>UL70</i> C881S	Forward	CGTCAAGCGGCGCGACGGCGCGCACGCGGGATTTTCGCTCTCTCAACTACACGCACCGCAATAGGGATAA CAGGGTAATCGATTT
	Reverse	CTTGACCGGTCTCTTGCGGGTTGCGGTGCGTGTAGTTGAGAGAGCGAAAATCCCGCGTGCGCG GCCAGTGTACAACCAATTAACC
<i>UL70</i> H886A	Forward	CGGCGCGCGCACGCGGGATTTTCGCTGTCTCAACTACACGGCCCGCAACCCGCAAGAGACCGTTAGGGATAA CAGGGTAATCGATTT
	Reverse	GCAAGTCGATGAACACTTGCACGGTCTCTTGCGGGTTGCGGGCCGTGTAGTTGAGACAGCGAAGCCAGTGT ACAACCAATTAACC-
<i>UL70</i> C915S	Forward	CGAGCACAGCTACGCGCTCTGGGCCAGCCTCTGGAGCCGCTCTTTCACCAAAAAGTGCTACTCTAGGGATAAC AGGGTAATCGATTT
	Reverse	TGTGGACGTTTTTGGCGTTGGAGTGACACTTTTTGGTGAAAGAGCGGCTCCAGAGGCTGGCCC GCCAGTGTACAACCAATTAACC
<i>UL70</i> C920S	Forward	GCTCTGGGCCAGCCTCTGGAGCCGCTGTTTCACCAAAAAGTCTCACTCCAACGCCAAAACGTTAGGGATAAC AGGGTAATCGATTT
	Reverse	TGATTTTGATGAAATGTGGACGTTTTTGGCGTTGGAGTGAGACTTTTTGGTGAAACAGCGCGCCAGTGTTA CAACCAATTAACC

Table S8: Sequences of *UL105*-primers used for screening and sequencing.

Primers	Primer direction	Primer sequence
<i>UL105</i> - Externe 1		AATCTCCTCGTGCAGGTGTG
<i>UL105</i> - Externe 2		TTTCTTTGGTCGAACCCGG
<i>UL105</i> - Interne 1		CGCACCAATCCACGTAGAGA
<i>UL105</i> - Interne 2		GATGTGTTCCCTGACGGTGT
<i>UL105</i> - 2	Forward	CTCCTCCGCCTCCTTCT
<i>UL105</i> - 3	Reverse	AGAAGAGGAGGCGGAGGAG
<i>UL105</i> - 4	Forward	GCTACGACCACTACACGCAA
<i>UL105</i> - 5	Reverse	TTCTGAATCAGCGCCGAGAG
<i>UL105</i> - 6	Forward	ACTTGGCGCGCATCATTAAAC
<i>UL105</i> - 7	Reverse	CATCGTCTGGAAAAACGCC
<i>UL105</i> - 8	Forward	TCGACGCGGATTCTTCTCAG
<i>UL105</i> - 9	Reverse	CTGAGAAGAATCCGCGTCGA
<i>UL105</i> - 10	Forward	GTTAACGTTTCGCGCTTCGT
<i>UL105</i> - 11	Reverse	GACGAAGCGGAAACGTAA

Table S9: Sequences of *UL70*-primers used for screening and sequencing.

Primers	Primer direction	Primer sequence
<i>UL70</i> - Externe 1		TTCTCGCAGTCCATGTCCAC
<i>UL70</i> - Externe 2		GGACAACGGGAACTCGGC
<i>UL70</i> - Interne 1		CCTCCGAGAGATAGCCCTTG
<i>UL70</i> - Interne 2		TCTCCGCGAGATGGTGTTC
<i>UL70</i> - 2	Forward	GCGAATTCAAGCACCTGGTG
<i>UL70</i> - 3	Reverse	CACCAGGTGCTTGAATTCGC
<i>UL70</i> - 4	Forward	AATACTTCTCGCTCGACAACT
<i>UL70</i> - 5	Reverse	AGTTGTCGAGCGAGAAGTATT
<i>UL70</i> - 6	Forward	CTTCAACGAACGTCTGCCC
<i>UL70</i> - 7	Reverse	AGCCGTAATCAAAGTCGGC
<i>UL70</i> - 8	Forward	ATGAACAGCGCAACAGAC
<i>UL70</i> - 9	Reverse	ACGTCAGCGAGCAGTTTACC
<i>UL70</i> - 10	Forward	TCGGGCGGTCTGATTTGA

Résumé

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 l'émergence de résistance et leur toxicité. Il devient alors nécessaire de développer de nouveaux traitements. L'étude des nouvelles mutations émergeant sous traitement antiviral demeure donc essentielle. L'introduction de ces nouvelles mutations, par mutagenèse « *en passant* », dans un chromosome bactérien artificiel contenant le génome viral nous permet, après transfection en cellules humaines, de tester la sensibilité de la souche recombinantes aux antiviraux. Différentes mutations de résistances ont ainsi été caractérisées. Afin de mettre en évidence de nouvelles cibles antivirales, des analyses bio-informatiques et la production de virus recombinants ont permis d'identifier de potentiels motifs fonctionnels essentiels à la réplication au sein du complexe terminase et hélicase-primase. Ainsi, nous avons montré que la sous-unité pUL56 du complexe terminase appartient à la famille des LAGLIDADG *Homing Endonuclease*. En effet, pUL56 contient un motif LATLNDIERFL et un motif de liaison à l'ADN. La technologie Alpha utilisant des protéines purifiées a permis de valider le caractère essentiel du fragment WMVVKYMGGFF de pUL56 pour l'interaction avec pUL89. Enfin, nous avons mis en évidence les résidus impliqués dans la fixation de l'ATP au sein de l'hélicase et dans la stabilisation du zinc de la primase. Ainsi, la compréhension de la structure de ces protéines pourrait permettre de mieux appréhender leur fonctionnement au sein du processus de réplication du CMVH et le développement de nouvelles thérapies ciblant ces domaines.

Mots clés : Cytomégalovirus, Résistances, Encapsidation, Terminase, Hélicase-Primase

Abstract

Human cytomegalovirus (HCMV) is an important opportunistic pathogen for immune-compromised 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. Then it becomes necessary to develop new treatments. Study of new mutations emerging under antiviral treatment is therefore essential. Introduction of these new mutations, by « *en passant* » mutagenesis, into an artificial bacterial chromosome containing the viral genome allows us, after transfection into human cells, testing antivirals sensitivity of the recombinant. Different mutations of resistances have been characterized. In order to highlight new antiviral targets, bioinformatics and recombinant viruses production allowed to identify potential functional patterns essential for viral replication within terminase and helicase-primase complex. Thus, we have shown that pUL56 subunit of the terminase complex belongs to the LAGLIDADG *Homing Endonuclease* family. Indeed, pUL56 contains a LATLNDIERFL motif and a DNA binding motif. Alpha technology using purified proteins allowed to validate the essential character of the WMVVKYMGGFF fragment of pUL56 for the interaction with pUL89. Finally, we highlighted the residues involved in ATP binding within the helicase and in the stabilization of zinc within the primase. Thus, understanding of these proteins structure could allow us to better understand their role within the viral replication process and the development of new therapies targeting these domains.

Keywords: Cytomegalovirus, Resistances, DNA-packaging, Terminase, Helicase-Primase